

A photograph of a cow standing in a field at sunset. The cow is in the foreground, slightly to the left, looking towards the camera. The background is a vast field of tall grass or crops, with a bright sun low on the horizon, creating a warm, golden glow. The sky is filled with soft, white clouds. The overall mood is peaceful and natural.

# NACHWEIS VON OSTEOPONTIN IN DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX DER RINDERPLAZENTA

**STEFANIE HALLACK**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: PD Dr. Christiane Pfarrer

# **Nachweis von Osteopontin in der extrazellulären Matrix der Rinderplazenta**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**STEFANIE HALLACK**

Tierärztin aus Gießen

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

---

1. Berichterstatterin: PD DR. Ch. Pfarrer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. H. Bostedt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2007

Meiner Mutter und meinem Bruder gewidmet

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>7</b>
<b>I. EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Übersicht über die Plazentaverhältnisse beim Rind.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Die extrazelluläre Matrix (ECM) .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Übersicht und allgemeine Definition .....	12
1.2.2 Vorkommen von ECM-Proteinen in Spezies mit epitheliochorialer Plazentation .....	13
1.2.3 ECM-Proteine in der hämochorialen Primatenplazenta .....	14
1.2.4 Osteopontin: Übersicht und allgemeine Definition .....	16
<b>1.3 Osteopontin im Reproduktionstrakt von Spezies mit epitheliochorialer Plazentation .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Osteopontin in der hämochorialen, menschlichen Plazenta .....</b>	<b>20</b>
<b>1.5 Integrine.....</b>	<b>21</b>
1.5.1 Übersicht und allgemeine Definition .....	21
1.5.2 Integrine in Spezies mit epitheliochorialer Plazentation .....	22
1.5.3 Integrine in hämochorialen Plazentationstypen .....	24
<b>1.6 Zielsetzung.....</b>	<b>26</b>
<b>II. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Entnahme und Fixierung der Proben .....	29
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Immunhistochemische Untersuchung .....	30
2.2.2 Immunfluoreszenz .....	32
2.2.3 RT-PCR .....	34
2.2.4 RNA in situ Hybridisierung mit digoxigenin-markierten RNA-Sonden .....	43
<b>III. ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Allgemeines zur Erfassung der immunhistochemischen Methoden .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Lokalisation von OPN Protein in der Rinderplazenta .....</b>	<b>49</b>
3.2.1 Osteopontin LF-123 und LF-124 in der Immunhistochemie .....	49
3.2.2 Osteopontin LF-123 und LF-124 in der Immunfluoreszenz .....	49

<b>3.3</b>	<b>Nachweis von OPN mittels molekularbiologischer Methoden .....</b>	<b>61</b>
3.3.1	Isolation von m-RNA .....	61
3.3.2	RT-PCR .....	62
3.3.3	Lokalisierung der OPN mRNA in der Rinderplazenta durch in situ Hybridisierung .....	63
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Kritische Betrachtung der Methoden .....</b>	<b>65</b>
<b>4.3</b>	<b>Vergleichende Betrachtung des Vorkommens von OPN bei den Tierarten Rind, Schaf und Schwein und beim Menschen .....</b>	<b>67</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>76</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>93</b>
<b>8.1</b>	<b>Verwendete Lösungen .....</b>	<b>93</b>
8.1.1	Verwendete Lösungen zu Kapitel 2.2.1 .....	93
8.1.2	Verwendete Lösungen zu Kapitel 2.2.3 .....	94
8.1.3	Verwendete Lösungen zu Kapitel 2.2.4 .....	96
	<b>Danksagung .....</b>	<b>100</b>

## Abkürzungen

A	Adenosin
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APAAP	Alkalische Phosphatase anti alkalische Phosphatase
APES	3-Aminopropyltriethoxysilane
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BNC	Binukleäre Zelle (Binuclear Cells)
C	Cytidin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CL	Zytoplasmatische Schleife
cm	Zentimeter
cRNA	Copy RNA
CT	Carboxylende
d	Tag (day)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithioreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
g	Gramm
G	Guanosin
h	Stunde
IHC	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
ISH	In situ Hybridisierung
m	männlich
M	mol
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3- Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
NCO	Restriktionsenzym
NOT	Restriktionsenzym
NT	Aminoende
NTB	Natriumchlorid Puffer
OPN	Osteopontin
p.i.	Post inseminationem
PBS	Phosphate buffered saline
PBSM	PBS Magnesiumchlorid
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur



## ABKÜRZUNGEN

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (standard saline citrate)
SSL	Scheitel-Steiss-Länge
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TNMT	0.1 M Tris-HCl [pH 7.5], 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.05% [v:v] Triton X-100
TRIS	Tris-8-Hydroxymethyl-9-Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolett
w	weiblich
V	Volt

## **I. EINLEITUNG und LITERATURÜBERSICHT**

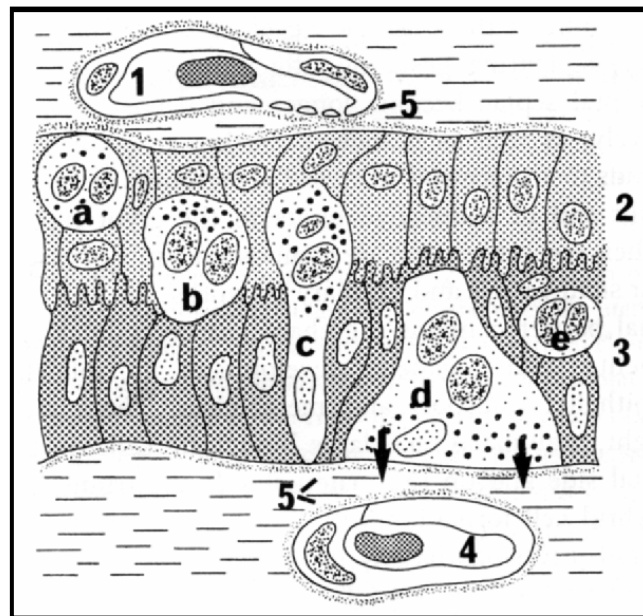
### **1.1 Übersicht über die Plazentaverhältnisse beim Rind**

Die Rinderplazenta wird nach Strahl (1911) als eine Semiplazenta multiplex sive cotyledonaria eingeteilt. Der Begriff Semiplazenta besagt, dass mit dem Abgang der Eihäute post partum keine Gewebsverluste und Blutungen aus den mütterlichen Gefäßen auftreten. Diesen Plazentatyp wird auch als adeciduate Plazenta bezeichnet. Aufgrund des Erhaltes aller Gewebeschichten, sowohl auf fetaler als auch auf maternaler Seite, gehört die Rinderplazenta zu den epitheliochorialen Plazentatypen (Grosser 1909, 1927). Eine Besonderheit ist die Ausbildung von Plazentomen, die am 30. Tag der Trächtigkeit beginnt und im 2.-3. Monat vollzogen ist (Björkmann et al. 1960).

Im Laufe der Gravidität bilden sich ca. 80-150 Plazentome aus, die beim Rind kissenförmig sind und aus zwei Anteilen, fetalen Kotyledonen (Placenta cotyledonaria) und maternalen Karunkeln, bestehen (Björkman und Sollen 1960). Im Bereich der Karunkeln bilden sich auf fetaler Seite aus den Primärzotten des Chorions die Kotyledonen (Björkmann et al. 1960). Ihre stark verzweigten Zotten senken sich in Form von Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten tief in die Krypten der Uteruskarunkeln ein und lösen sich bei der Geburt ohne Gewebsverlust (Übersicht Leiser und Kaufmann 1994). Diese Art der fetomaternalen Interdigitation bezeichnen Leiser und Kaufmann (1994) als villösen Typ der Plazentation.

Im Chorionepithel, welches die fetalen Zotten überzieht, unterscheidet man zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen (Wimsatt 1951, Greenstein et al. 1958, Wooding 1992): zum einen die uninukleären Trophoblastzellen, die einer Basalmembran aufsitzen und untereinander durch apikale Tight junctions verbunden sind. Diese stehen durch einen interdigitierenden Mikrovillisaum mit dem Uterusepithel in Kontakt und bilden so die feto-maternale Kontaktzone (Björkman 1969). Der zweite Zelltyp ist in der Rinderplazenta meistens zweikernig und wird deshalb auch „binucleate cell“ (BNC, Wimsatt 1951, Wooding 1992) oder „trophoblast giant cell“ (TGC, Klisch et al. 1999) genannt, da sie auch drei- bis siebenkernig vorkommen können und einen DNA-Gehalt von bis zu 32 C besitzen können. Es wird angenommen, dass TGC von uninukleären Trophoblastzellen abstammen und durch azytokinetische Mitose derselben entstehen (Wimsatt 1951, Björkman 1968, Wooding 1992).

Die TGC zeigen die morphologischen Charakteristika von epithelialen Zellen nicht, das heißt, sie haben weder Kontakt mit der Basallamina, noch besitzen sie einen apikalen Mikrovillisaum. Durch fehlende Polarität können sie auf das uterine Epithel zu migrieren (Wimsatt 1951, Davies und Wimsatt 1966) und mit einzelnen Uterusepithelzellen fusionieren (Wooding 1992). Die Fusion von TGC mit Uterusepithelzellen beginnt beim Rind schon während der Implantationsphase und hält während der ganzen Trächtigkeit an (Wooding 1992). Hierdurch entstehen meist dreikernige feto-maternale Hybridzellen oder Synzytien (Wooding und Flint 1994, Klisch et al. 1999). In diesem Zusammenhang prägte Wooding (1992) die Bezeichnung Placenta synepitheliochorialis. Die TGC enthalten Hormone und Glykoproteine, wie plazentäres Laktogen und graviditätsspezifische Glykoproteine, die über die Fusion mit jeweils einer Uterusepithelzelle an das maternale Kompartiment abgegeben werden (Wooding 1992, Klisch et al. 1999). Die im Zusammenhang mit der Fusion entstehenden Synzytien können während der Trächtigkeit atrophieren und sogar verschwinden (Björkman und Sollen 1960). Hierfür ist möglicherweise eine Degeneration über apoptotische Prozesse verantwortlich (Hoffmann and Wooding 1993), deren Restprodukte anschließend von Trophoblastzellen resorbiert werden (Schuler et al. 1999). Vereinzelte Synzytien bleiben vorläufig bestehen, werden aber in der späteren Trächtigkeit atrophisch und verschwinden (Björkman und Sollen 1960).



Übersicht 1: Schematische Zeichnung der histologischen Verhältnisse in der Placenta synepitheliochorialis der Kuh. **1**, Fetale Blutgefäße; **2**, Trophoblast; **3**, Uterusepithel; **4**, Maternale Blutgefäße; **5**, Basalmembranen; die Zellen mit der Markierung **a-e** zeigen die Migration (**a**, **b**) und Fusion (**c**) der zweikernigen Trophoblastriesenzellen mit einzelnen Uterusepithelzellen, sowie eine feto-maternale Hybridzelle (**d**), welche ihren granulären Inhalt in das maternale Stroma sezerniert und degenerative Hybridzellen (**e**) (Dantzer 1999, modifiziert nach Leiser und Kaufmann 1994).

## **1.2 Die extrazelluläre Matrix (ECM)**

### **1.2.1 Übersicht und allgemeine Definition**

Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus unlöslichen Kollagenfasern und löslichen Proteinen, die in Multiadhäsionsmatrixproteine und Proteoglykane unterteilt werden, zusammen (Lodish et al. 2001). Verbreitete Moleküle der ECM sind beispielsweise Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Kollagen und Osteopontin.

Die Hauptgruppe der unlöslichen Faserproteine stellen die Kollagene dar. Alle 16 Kollagentypen enthalten wiederholte Glyzin, Prolin und Hydroxyprolin Sequenzen, die die Grundlage der charakteristischen Tripelhelixstruktur sind (Alberts et al. 1999). Die im Körper vorkommenden Kollagene sind zu 80-90% fibrilläre Kollagene der Typen I, II und III, deren Fibrillen durch Aldolquerbrücken stabilisiert werden (Lodish et al. 2001). Das netzbildende Kollagen vom Typ IV bildet ein zweidimensionales Netzwerk in der Basallamina aus (Alberts et al. 1999). Proteoglykane sind in allen Bindegeweben, in jeder ECM und auf der Oberfläche zahlreicher Zellen zu finden. Wegen ihres hohen Gehalts an geladenen Polysacchariden sind die Proteoglykane stark hydratisiert. Die wasserhaltige, gelartige Grundsubstanz, in der die Faserproteine eingebettet sind, wird von den Proteoglykanen gebildet und formt das Volumen der ECM. Diese wässrige Phase erlaubt die Diffusion von kleinen Molekülen zwischen den Zellen und Geweben (Alberts et al. 1999).

Fibronectine sind Multiadhäsionsproteine, die Kollagen und andere Matrixproteine mit Integrinrezeptoren in der Plasmamembran verbinden und somit eine Verbindung zwischen Zellen und Matrix herstellen (Lodish et al. 2001). Mit der Anheftung beeinflussen sie die Zellgestalt und die Anordnung des Zytoskeletts. Außerdem sind sie an der Differenzierung und Wanderung zahlreicher Zellarten während der Embryogenese beteiligt und fördern die Wundheilung (Lodish et al. 2001). Fibronectine bestehen aus zwei Polypeptiden, die über zwei Disulfidbrücken an ihren C-Termini verbunden sind. Jede dieser Ketten ist etwa 60-70 nm lang und 2-3 nm dick. Ein Bereich, der für die Zellbindung verantwortlich ist, konnte als Tripeptid-Sequenz Arg-Gly-Asp oder RGD charakterisiert werden und wird von Integrinen, einer Familie homologer Zelloberflächenrezeptoren, erkannt (Main et al. 1992).

Laminin ist, zusammen mit Kollagen IV, Hauptbestandteil des zweidimensionalen Netzwerkes der Basallamina (Alberts et al. 1999). Es besteht aus einem großen

Komplex mit drei sehr langen, asymmetrisch-kreuzförmig angeordneten Polypeptidketten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ), deren Länge der Dicke der Basallamina entspricht. Fünf  $\alpha$ -, drei  $\beta$ - und zwei  $\gamma$ -Ketten können differenziert werden, woraus 11 Laminin-Isoformen unterschieden werden (Beck et al. 1990, Miner et al. 1997). Wie viele andere Proteine der ECM, besitzt auch Laminin mehrere Domänen, die an Heparansulfat, Kollagen IV und an Rezeptorproteine der Zelloberfläche binden können. In funktioneller Hinsicht dient dies nicht nur der Zelladhäsion, -migration und -proliferation, sondern spielt auch in der frühen Entwicklungsphase eine bedeutende Rolle (Alberts et al. 1999).

### 1.2.2 Vorkommen von ECM-Proteinen in Spezies mit epitheliochorialer Plazentation

Das Verteilungsmuster der einzelnen ECM-Proteine wurde während der Implantation und in der frühen Trächtigkeit bei verschiedenen Spezies mit epitheliochorialer Plazentation untersucht. Laminin und Kollagen IV sind beide im Endometrium des Rindes nachweisbar, wobei sie ein identisches Verteilungsmuster zeigen (MacIntyre et al. 2002). Beide ECM-Proteine sind außerdem in den Basalmembranen von Uterusdrüsenepithel und Uteruslumenepithel sowie im uterinen Stroma während jeder Phase der Trächtigkeit vorhanden (MacIntyre et al. 2002). Dabei erfolgt ein kontinuierlicher Anstieg von beiden zwischen dem 18. bis 30. Tag post inseminationem (p.i.). Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass am Tag 18 vermehrt Laminin im Trophoblasten lokalisiert ist, welches dann aber rapide am Tag 21 abnimmt (Boos 2000, MacIntyre et al. 2002).

Fibronektin wurde in der sich entwickelnden Plazenta im uterinen Stroma und auf der Oberfläche sehr früher bovinen Embryonen gefunden (Mac Laren und Wildeman 1995). Bei der Ziege beschreibt Guillomot (1999) vom Tag 15 bis 21 der Trächtigkeit ein kontinuierliches Verschwinden von Kollagen IV und Laminin in den Basalmembranen von Uterusepithel, Drüsenepithel und Blutgefäßen nach Kontaktaufnahme mit dem Trophoblasten. Gleichzeitig zeigt die Basalmembran des Trophoblasten eine positive Immunreaktion auf Kollagen I, VI und Laminin. In den Bereichen, in denen keine Implantation stattfindet, bleibt die Verteilung von Kollagen IV und Laminin unverändert (Guillomot 1998).

Im Gegensatz dazu kommt es beim Schwein zu keinerlei Umbauvorgängen in der Basalmembran der Epithelien (Bowen et al. 1996). Fibronectin ist während der frühen Implantation auf dem Trophoblasten und im Uteruslumen lokalisiert (Bowen et al. 1996). Tue et al. (1996) berichten, dass die glykosylierte Variante von Fibronectin, oncofetales Fibronectin, während der ganzen Trächtigkeit im Trophoblasten, Uterusepithel und Drüsenepithelzellen lokalisiert ist. Die Anwesenheit von oncofetalem Fibronectin an der feto-maternalen Kontaktzone deutet auf eine Beteiligung an Wechselwirkungen zwischen uterinem Epithel und dem Trophoblasten und bei der Anheftung am Endometrium hin (Feinberg et al. 1994). Die immunzytochemische Analyse von Fibronectin und oncofetalem Fibronectin im Endometrium und im Trophoblasten des Schafes zeigt, dass das oncofetale Fibronectin überwiegend entlang der apikalen Oberfläche von Uterusepithel und Drüsenepithel wie auch im Trophoblasten lokalisiert ist (Feinberg et al. 1991).

### 1.2.3 ECM-Proteine in der hämochorialen Primatenplazenta

Im ersten Drittel der Schwangerschaft sind Deziduazellen in einem Netzwerk aus Kollagen I und III eingebettet, wobei Kollagen IV und Laminin in der externen Lamina um die Deziduazellen lokalisiert waren und Fibronectin in der gesamten extrazellulären Matrix beobachtet wurde (Kisalus et al. 1987). Alle diese Matrixproteine wurden durch Immunfluoreszenz nachgewiesen und die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Matrixproduktion eine Hauptfunktion der Deziduazellen im ersten Drittel der Schwangerschaft ist (Kisalus et al. 1987).

Invasive extravillöse Trophoblastzellen sind in ihrer selbstsezernierten extrazellulären Matrix, dem sogenannten matrix-typischen Fibrinoid, eingebettet (Frank et al. 1994, 1995). Fibrinoid wird in zwei Phänotypen unterteilt, erstens in das fibrin-typische Fibrinoid und zweitens in das matrix-typische Fibrinoid (Frank et al. 1994, Lang et al. 1994), die beide separiert von einander gefunden werden (Benirschke und Kaufmann 1995).

Das matrix-typische Fibrinoid als Sekretionsprodukt der extravillösen Trophoblastzellen (Frank et al. 1994, 1995) ist hauptsächlich in der Basalplatte lokalisiert, in der ihm verschiedene Funktionen zugesprochen werden. Einerseits verankert es die Plazenta im maternalen Gewebe und andererseits ermöglicht es extravillösen Trophoblastzellen in

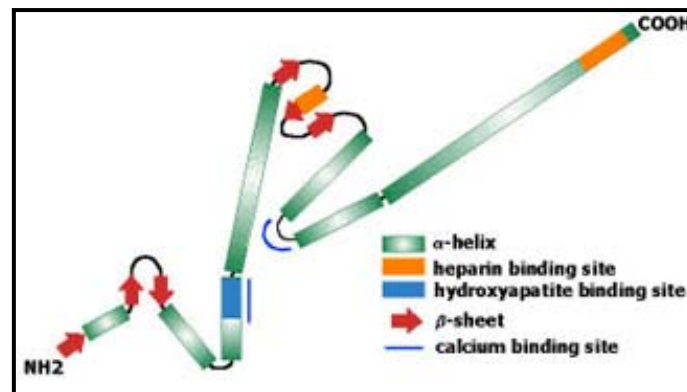
maternales Gewebe einzudringen (Feinberg et al. 1991). Um diesen unterschiedlichen Aufgaben gerecht werden zu können, setzt sich das matrix-typische Fibrinoid aus verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen, wie den Basalmembran-Vertretern Laminin, Kollagen IV und Heparansulfat (Castellucci et al. 1993, Frank et al. 1994), sowie Fibronectin, zusammen (Feinberg et al. 1991, Frank et al. 1994, 1995).

Zahlreiche Untersuchungen zur Verteilung der ECM Proteine wurden auch an Plazenten des Makaken und Pavian durchgeführt (Blankenship et al. 1992, 1993, King et al. 1994, Fazleabas et al. 1997, Pijnenborg et al. 1996). In allen Trächtigkeitsstadien findet man in der Plazenta von Makaken teils beträchtliche Mengen extrazellulärer Matrixproteine (Blankenship et al. 1992, 1993). In den frühen Trächtigkeitstadien weisen die Trophoblastzellen im Bereich der Zotten eine verdickte Basalmembran auf, die aus Kollagen IV und Laminin, sowie im geringen Maße aus Fibronectin besteht (Blankenship et al. 1992, 1993). Distal gelegene Trophoblastzellen zeigen gegenüber proximal gelegenen Trophoblastzellen interzellulär deutlich größere Mengen an Kollagen IV, Laminin und Fibronectin (Blankenship et al. 1992, 1993). In der späten Trächtigkeitsphase sind die Matrixproteine in der Basalmembran nur noch schwach vorhanden (Blankenship et al. 1992, 1993). Am Übergang zum maternalen Gewebe verschwinden Kollagen IV, Laminin und Fibronectin und sind nicht mehr nachweisbar (Blankenship et al. 1992, 1993). Beim Pavian findet man um die Deziduazellen der frühen Trächtigkeitsphase reichlich Kollagen IV, Laminin und Fibronectin (Fazleabas et al. 1997). Im eingedrungenen Trophoblasten kann zudem Fibronectin nachgewiesen werden (Pijnenborg et al. 1996).



#### 1.2.4 Osteopontin: Übersicht und allgemeine Definition

Osteopontin (OPN) ist ein säurehaltiges phosphoryliertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 70 Kilodalton (kDa), das aus 301 Aminosäuren besteht. Ein entscheidender Teil der cDNA ist die Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-(GRGDS) Sequenz (Butler 1989), die bei allen Säugetierspezies in hohem Maße konserviert ist (Mazzali et al. 2002). Durch Gefrieren und wieder Auftauen oder durch eine Behandlung mit Proteasen wird das 70 kDa Protein in 24 kDa und 45 kDa Proteinfragmente gespalten (Weber und Cantor 1996). Es ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) (Butler 1989) und wurde zuerst aus Ratten-, Menschen- und Rinderknochen isoliert (Franzen et al. 1985), wo es gleichermaßen von Osteoklasten und Osteoblasten gebildet wird. Später entdeckte man es in unterschiedlichen Geweben und Sekreten, wie im Gastrointestinaltrakt, in der Schilddrüse und Niere, in Hoden und Ovarien, im Uterus, in Trophoblastzellen und in der Plazenta (Young et al. 1990, Brown et al. 1992, McKee et al. 1995, Johnson et al. 1999, Gabler et al. 1999). OPN ist bei folgenden Vorgängen beteiligt: Aktivierung der Zell-Zell Bindung, Vermehrung der Zell-ECM Verbindungen, Förderung der Migration von Immunzellen, Osteozyten und Tumorzellen, Verringerung des Zellsterbens durch eine Reduzierung von freien Radikalen sowie die Stimulierung von B-Zellen zur Immunglobulinsynthese (Nabel et al. 1981, Leibson et al. 1981, Butler 1989, Miyauchi et al. 1991, Denhardt et al. 1993, Liaw et al. 1995, Weber et al. 1996). Außerdem verändert es den intrazellulären Kalziumspiegel und fördert die Kalziumphosphat Einlagerung in die Knochen (Butler 1989, Miyauchi et al. 1991, Denhardt et al. 1993, McKee et al. 1995). Als Matrixbestandteil ist OPN auch ein Ligand für Integrinrezeptoren an Trophektoderm und Endometrium und ist so an der Vermittlung der Implantation des Keimes im Uterus beteiligt (Johnson et al. 1999). Es wird generell akzeptiert, dass OPN in erster Linie an die Arg-Gly-Asp (RGD) Sequenz des  $\alpha_v\beta_3$  Integrinrezeptors bindet (Burghardt et al. 2002). Allerdings können die Integrinheterodimere  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_4\beta_1$  ebenfalls Bindungen mit der RGD Sequenz eingehen (Hu et al. 1995, Denda et al. 1998).



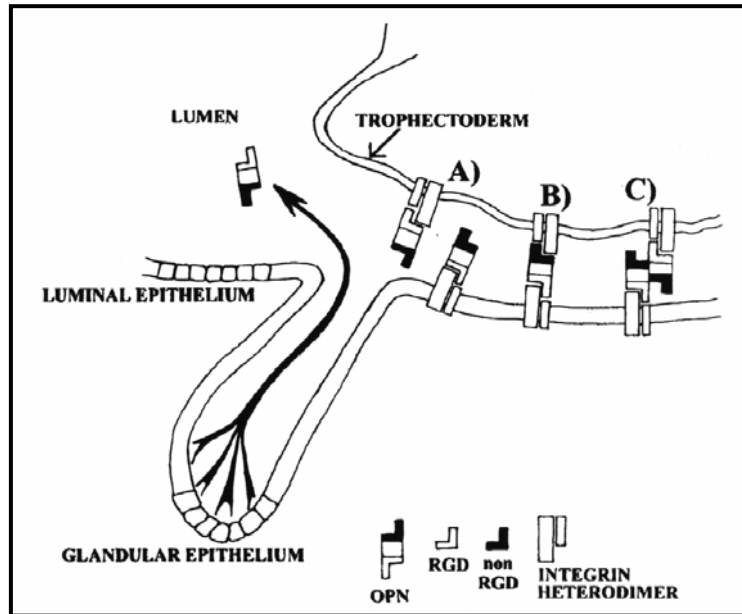
Osteopontin: Molekülstruktur von Franzen und Heinegard, Universität Freiburg  
 Homepage: <http://www.cmb.lu.se/ctb/html/OPN.htm>

### 1.3 Osteopontin im Reproduktionstrakt von Spezies mit epitheliochorialer Plazentation

Studien an Schafen zeigten, dass es einen OPN mRNA Anstieg in den uterinen Drüsen von tragenden Tieren zwischen dem 13. und 19. Tag der Trächtigkeit gibt, wohingegen OPN mRNA weder im Trophoblast noch im Uterusepithel nachzuweisen ist (Johnson et al. 1999). Immunreaktives OPN Protein kommt bei zyklischen Schafen zwischen dem 1. und 15. Tag sowie bei tragenden Schafen zwischen dem 1. und 19. Tag vor und ist an der apikalen Oberfläche von Uterusepithel und Drüsenepithel lokalisiert (Johnson et al. 1999). Es wird vermutet, dass das in das Uteruslumen sezernierte OPN Protein als gemeinsamer Ligand für  $\alpha_v\beta_3$  Integrine an Trophoblast und Uterusepithel dient. Auf diese Weise wird die Morphologie des Trophoblasten verändert und die Anheftung zwischen Uterusepithel und Trophoblast eingeleitet. Dieses spielt möglicherweise bei der Implantation und Plazentation des Schafes eine Rolle (Johnson et al. 1999). In vitro Versuche, in denen mit OPN überzogene Kügelchen auf kultivierte Zellen luminalen Epithels gegeben wurden, haben gezeigt, dass sich in den Zellen mikrofilamentassoziierte Proteine, wie Talin aggregieren. Diese Tatsache spricht für eine funktionelle Beteiligung von OPN an der Adhäsion und Einnistung der Blastozyste (Johnson et al. 2001).

Beim Schwein, welches eine echte Plazenta epitheliochorialis besitzt (Dantzer et al. 1981), wird OPN mRNA von dem luminalen Epithel des Uterus ab dem 12. Tag der

Trächtigkeit und vom Epithel der uterinen Drüsen ab Tag 35 ausgeschüttet, während der Trophoblast keine Expression von OPN mRNA zeigt (Garlow et al. 2002). Das OPN Protein wird wiederum im Uteruslumen gefunden und dort speziell im Epithel des uterinen Lumens und der Drüsen, sowie in den Trophoblastzellen. Das Vorkommen von OPN Protein an der apikalen Oberfläche von Trophoblast sowie luminalem und Drüsenepithel während der Trächtigkeit kann ein Beweis dafür sein, dass OPN als eine Art Klebstoff zwischen Trophoblast und luminalen Epithel fungiert und somit für Implantation und epitheliochoriale Plazentation des Schweins eine wichtige Rolle spielt (Garlow et al. 2002). Damit lassen sich einige Aspekte der endometrialen OPN mRNA Ausschüttung beim Schwein mit denen des Schafes vergleichen (Johnson et al. 1999). Das Vorkommen von OPN mRNA im luminalen Epithel des Uterus hingegen wurde nur beim Schwein beobachtet. Dagegen ist die Expression von OPN mRNA bei Tierarten mit einer invasiven Implantation, wie Primaten (Brown et al. 1992, Omigbodun et al. 1997) und Mäusen (Nomura et al. 1988), auf die Drüsenepithelien begrenzt. Bei Schafen, die eine zentrale und nicht invasive Implantation haben, gilt das gleiche, OPN mRNA wird nur in den Drüsenepithelien von tragenden Schafen gefunden (Johnson et al. 1999, Johnson et al. 2001), und nicht im luminalen Epithel des Uterus. Dennoch wird OPN die gleiche Funktion wie in der Schweineplazenta zugesprochen. Durch die Bindung von OPN an Integrine zwischen Uterus und Trophoblast kommt es zu funktionellen intrazellulären Signalen, die die Entwicklung des Trophoblasten, die Anheftung und die Plazentation beeinflussen. Die Autoren schlussfolgern, dass die Anwesenheit und die Regulierung von OPN eine funktionelle Bedeutung haben und Voraussetzung für eine erfolgreiche Trächtigkeit sind (Garlow et al. 2002).



Übersicht 2. aus Johnson et al. 1999. Schematische Darstellung des hypothetischen Zusammenspiels von Integrinrezeptoren des Trophoblasten und des Uterusepithels über OPN. OPN wird vom Epithel der uterinen Drüsen ausgeschüttet und agiert mit Integrinheterodimeren auf der Oberfläche von Trophektoderm- und Uterusepithelzellen mit ihrer RGD Sequenz (A) oder nicht-RGD Sequenzen (B). OPN hat mehr als eine Bindungsstelle und besitzt somit die Funktion als extrazellulärer Brückenligand durch seine multiplen RGD Interaktionen mit  $\alpha_v\beta_3$  Integrinen (C).

## 1.4 Osteopontin in der hämochorialen, menschlichen Plazenta

Gegenstand der Forschung beim Menschen, für den Nachweis von OPN im Reproduktionstrakt, sind zahlreiche Untersuchungen an gesunden Frauen während des Menstruationszyklus und von Schwangeren im ersten Drittel der Gravidität. OPN wird in großen Mengen in Deziduazellen und endometrialen Drüsenzellen in der Sekretionsphase, während der Trophoblastinvasion, in den uterinen Drüsen sowie während der Implantation und der Plazentation und in der Plazenta bei schwangeren beschrieben (Brown et al. 1992, Young et al. 1990, Nomura et al. 1988). Bis zur Mitte der Sekretionsphase des Endometriums, in der die Implantation stattfindet, steigert sich die Expression von OPN. Transkripte für OPN und den zugehörigen Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$  Integrin sind im Drüsenepithel zu finden, wohingegen OPN Protein hauptsächlich im luminalen Uterusepithel zu finden ist (Apparao et al. 2001). Außerdem wurde eine Kolo-kalisation von OPN und seinem Rezeptor, dem  $\alpha_v\beta_3$  Integrin, in Deziduazellen beim Mensch (Omigbodun et al. 1997) beobachtet, ein Befund der den oben aufgeführten der Sekretionsphase des Endometriums bei Schafen entspricht (Johnson et al. 1999). OPN ist in der Lage, Adhäsionen und Migrationen von verschiedenen Zelltypen durch ein Zusammenspiel mit verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren, den Integrinen, zu vermitteln. Es wird vermutet, dass die  $\alpha_v\beta_3$  Integrinrezeptoren und OPN eine ergänzende Rolle während des Implantationsprozesses spielen (Apparao et al. 2001). Die OPN Expression im menschlichen Trophoblasten wird durch Progesteron reguliert (Omigbodun et al. 1997). Die Zunahme der Expression von OPN und  $\alpha_v\beta_3$  Integrinrezeptoren in der Progesteron-dominanten Phase des Menstruationszyklus unterstreicht die Rolle von Progesteron in der Implantation (Apparao et al. 2001). Grundsätzlich würde eine Schwangerschaft im frühen Stadium ohne Progesteron nicht bestehen bleiben (Baulieu 1989). Das trifft auch für die nicht invasiven, epitheliochorialen Verhältnisse bei Schaf und Schwein zu (Johnson et al. 1999) und deutet darauf hin, dass die epitheliale Progesteron-Abregulation für die Auslösung der Sekretionsfunktion der endometrialen Drüsen erforderlich ist, um so eine Aufregulierung der OPN Expression zu induzieren (Geisert et al. 1994, Spencer et al. 1995 und Johnson et al. 1999).

## 1.5 Integrine

### 1.5.1 Übersicht und allgemeine Definition

Integrine gehören zu der großen Familie der homologen Transmembran-Verbindungsproteine und sind die wichtigsten Rezeptoren auf Zellen, mit denen sich die meisten Matrixproteine wie Osteopontin, Kollagen, Fibronectin und Laminin verbinden können (Hynes 1987). Sie bestehen aus zwei nicht kovalent verbundenen Transmembran-Glykoprotein  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (Alberts et al. 1999). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Integrine aus einer pilzartigen extrazellulären N-terminalen Region und einem C-terminalen Schwanz, welcher durch die Plasmamembran hindurch ins Zytoplasma hineinragt, bestehen (Longhurst et al. 1998). Die Ligandenbindungsstelle auf der Zelloberfläche besteht aus Anteilen beider Untereinheiten und dient gemeinsam der Adhäsion von Proteinen der ECM. Es sind bis heute 24 verschiedene Integrinheterodimere identifiziert worden, die sich aus 18 verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten sowie aus 8 unterschiedlichen  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzen können. Durch die Wechselwirkung einzelner  $\beta$ -Untereinheiten mit verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten entstehen Integrinmoleküle, die unterschiedliche Liganden binden (Van der Flier et al. 2001). Die Bindung zwischen Integrinen und ihren Liganden ist von der Anwesenheit extrazellulärer zweiwertiger Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ ) abhängig, die von dem extrazellulären Teil der  $\alpha$ -Kette gebunden werden können (Ginsberg et al. 1988, Hemler 1988). Eine der am häufigsten nachgewiesenen Aminosäurefrequenzen in Integrinliganden ist die Arg-Gly-Asp (RGD)-Sequenz, die man in Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen, Thrombospondin, Laminin, Osteopontin und Kollagen vom Typ I (Ruoslathi und Pierschbacher 1987) findet.

Integrine befinden sich normalerweise in einem „low affinity“-Status und können ohne einen bestimmten Aktivierungsprozess nicht an Liganden binden. Diese als „inside-out-signalling“ beschriebene Aktivierung müssen  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , und  $\beta_3$  Integrin-Familien zuerst erfahren, um überhaupt an Liganden der ECM binden zu können (Longhurst et al. 1998).

### 1.5.2 Integrine in Spezies mit epitheliochorialer Plazentation

Die meisten Befunde zum Vorkommen von Integrin-Rezeptoren im weiblichen Reproduktionstrakt stammen aus klinischen Studien und Experimenten mit Nagetieren, die einen invasiven Trophoblasten aufweisen. Erst kürzlich wurden Ergebnisse von Studien an Spezies mit nicht invasiver, epitheliochorialer Plazentation veröffentlicht (Schwein: Bowen et al. 1996; Schaf: Johnson et al. 2001; Rind: MacIntyre et al. 2002, Pfarrer et al. 2003). Sieben verschiedene Integrinheterodimere, fünf  $\alpha$ - und zwei  $\beta$  Untereinheiten, werden im Endometrium und im Trophoblast beim Schwein beschrieben (Bowen et al. 1996). Die Integrin Untereinheiten  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_5$  treten beim Schwein im luminalen Epithel und im Trophoblast auf und sind am Implantationsort lokalisiert (Bowen et al. 1996). Diese Untereinheiten sind möglicherweise an der Bildung der Integrinrezeptoren  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  an der feto-maternalen Grenzfläche während der Trächtigkeit beteiligt und fungieren so als Teil einer Adhäsionskaskade, die sowohl zur stabilen Adhäsion zwischen zwei epithelialen Oberflächen als auch zur Aktivierung der „outside-in“ Signaltransduktion führt (Burghardt et al. 1997). Die Integrinuntereinheiten  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  und  $\beta_1$  werden räumlich und zeitlich während des Östrus und der frühen Trächtigkeit reguliert und erreichen ihre maximale Expression während des "Implantationsfensters" (Bowen et al. 1996).

Die Untereinheiten  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_5$  treten im Endometrium bei Schafen während des Zyklus und im Stadium der Gravidität im Trophoblasten ab Tag 15 auf. OPN Protein wird ab Tag 19 im Uteruslumen nachgewiesen und dient vermutlich als Ligand für das  $\alpha_v\beta_3$  Integrin, welches ebenfalls ab Tag 19 im Endometrium und Trophoblast vorhanden ist und über die RGD Sequenz an OPN binden kann (Hu et al. 1995). Das 45 kDa große OPN-Fragment bindet mit einer wesentlich höheren Affinität an den Integrinrezeptor  $\alpha_v\beta_3$  als das natürliche 70 kDa OPN (Senger et al. 1996). Das 45 kDa OPN Fragment ist schon ab dem 14. Tag p. i. apikal in den Epithelien des Uteruslumens, ab dem 20. Tag im Trophektoderm und entlang der feto-maternalen Kontaktlinie bis Tag 120 p. i. zu finden und kann somit schon früh eine Bindung mit dem Integrinrezeptor  $\alpha_v\beta_3$  eingehen (Johnson et al. 2003). Mit Immunfluoreszenz wurden die Untereinheiten  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_5$  im luminalen Epithel des Endometriums, im Drüsenepithel und im Trophoblast von Schafen detektiert (Johnson et al. 2001).

Beim Rind sind  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$ ,  $\beta_1$  und der Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$  an der basolateralen Oberfläche des luminalen Epithels, im Epithel der oberflächlichen Drüsen und im subluminalen Stroma des Uterus lokalisiert (Kimmins und MacLaren 1999). Das Schema der Expression von  $\alpha_v\beta_3$  verändert sich während des gesamten Östrus. Der Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$  zeigt eine hohe Expression im luminalen Epithel und unterhalb der subepithelialen Stromazellen während des Proöstrus, Östrus und Metöstrus. Im Diöstrus ist die Expression im subepithelialen Stroma vermindert, dies wurde von Kimmins und MacLaren (1999) durch Immunhistochemie nachgewiesen. Im Weiteren konnte in Rinderembryonen mit Hilfe der PCR-Technik die mRNA der  $\beta_1$  und  $\alpha_5$  Untereinheiten lokalisiert werden (MacLaren und Wildeman 1995). Sowohl uni- als auch binukleäre Trophoblastzellen exprimieren während der Implantation, das heißt ab 24. Tag post conceptionem, die  $\beta_1$  Untereinheiten, woraus MacLaren und Wildeman (1995) eine funktionelle Beteiligung dieser Integrinuntereinheit an der Migration und Entwicklung der Zellen schließen. Nach Hirsch (2000) ist das  $\beta_1$  Integrin beim Rind in den TGC besonders in der frühen Plazentation nachzuweisen. Daneben ist  $\beta_1$  und  $\alpha_1$  basal an fetalen und maternalen Epithelien zu finden, wo es mit  $\alpha_6$  einen Rezeptor für das Laminin der Basalmembran bilden kann. Dabei ist anzumerken, dass  $\alpha_2$ ,  $\alpha_6$  und  $\beta_1$  die einzigen Integrinuntereinheiten sind, die beim Rind von Trophoblastzellen fast während der gesamten Plazentation (80.-270. Tag) exprimiert werden (Hirsch 2000). Pfarrer et al. (2003) vermuten, dass die TGC entlang ihrer „eigenen“ Lamininmatrix migrieren und Zell-Zell-Kontakte mit benachbarten Zellen über das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  vermitteln. Während der Implantation der Ziege wurde die  $\beta_1$  Integrinuntereinheit entlang der basolateralen Membranen von luminalem und Drüsenepithel lokalisiert, wobei die Expression von  $\beta_1$  in den luminalen Epithelzellen während der embryonalen Adhäsion abnimmt (Guillomot 1999).

Die Anwesenheit von Integrinrezeptoren im Endometrium und Trophektoderm weist darauf hin, dass diese als Vermittler für die embryonale Anheftung mit dem uterinen luminalen Epithel dienen. Dieses trifft möglicherweise für weitere Säugetierarten zu. Die Untereinheiten  $\alpha_v$  und  $\beta_3$  spielen bei dieser Anheftung eine besondere Rolle, weil sie als Heterodimer OPN binden, welches dann als Brückenmolekül fungiert (Omigbodun et al. 1995, Johnson et al. 2001).



### 1.5.3 Integrine in hämochorialen Plazentationstypen

Im menschlichen Endometrium wurden 14 verschiedene Integrinheterodimere identifiziert, die aus 9 verschiedenen  $\alpha$ - und 5  $\beta$ -Untereinheiten zusammengesetzt sind. Die beiden zyklusabhängigen Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_4\beta_1$  werden im sogenannten Implantationsfenster („window of implantation“) im Endometrium exprimiert und sind ein wichtiges Merkmal uteriner Empfänglichkeit (Lessey et al. 1994). Integrine scheinen also eine große Rolle während der Implantationsphase und beim Aufbau der Dezidua einzunehmen (Lessey et al. 1992, 1994, 2000; Illera et al. 2000). Im ersten Drittel der Schwangerschaft findet man in den Zellen des Zottenstromas die Integrinuntereinheiten  $\alpha_1$  und  $\beta_1$ . Ihre Expression nimmt in späteren Stadien ab und ist in Plazenten zum Geburtstermin nicht mehr nachweisbar. Transkripte von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  wurden in den uterinen Drüsenepithelien nachgewiesen und das Protein war besonders entlang der apikalen Oberfläche vom luminalen Epithel lokalisiert (Apparao et al. 2001). In der Implantationsphase geht die maximale Expression von  $\alpha_v\beta_3$  Integrin mit einem Anstieg von Progesteron einher (Lessey et al. 1996), während eine abnormale Expression von  $\alpha_v\beta_3$  Integrin mit einer Unfruchtbarkeit verbunden ist (Lessey et al. 1996). Vanderpuye et al. (1991) fanden heraus, dass Integrin  $\alpha_v\beta_3$  von humanen Synzytiotrophoblasten exprimiert wird, nicht aber von Zytotrophoblastzellen. Durch dieses Integrin wird die Adhäsion zwischen humanen Trophoblastzellen und OPN vermittelt (Omigbodun et al. 1995). Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass diese Ligand-Rezeptor (OPN- $\alpha_v\beta_3$ ) Bindung die Adhäsion und die Verbindung zwischen zwei Zellschichten einleitet und wahrscheinlich somit die lebenswichtige strukturelle Integrität der Chorionzotten bestimmt (Omigbodun et al. 1997).

Analysen am Implantationsort zeigen auf, dass Integrinuntereinheiten wie  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_3$  genau an der Stelle des Trophoblasten auftreten, die Kontakt mit dem Uterusepithel aufnehmen. Die Rezeptoren  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  wurden in Studien am Mensch während des wichtigen Ereignisses der Adhäsion identifiziert (Omigbodun et al. 1997). Sie sind alle Mitglieder der Fibronektin-Vitronektin Familie der Integrin Rezeptoren (Hynes 1992).

Die räumliche und zeitliche Verteilung und Modulation von verschiedenen Integrinuntereinheiten im Reproduktionstrakt der Frau während des Menstruationszyklus und der

frühen Schwangerschaft, geben Grund zur Annahme, dass sie direkt in die Implantation involviert sind (Tabibzadeh 1990; Lessey et al. 1992).

Das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  und der Ligand Osteopontin werden bei Pavianen im Drüsenepithel und in den Dezidua-Zellen exprimiert (Fazleabas et al. 1997). Sutherland et al. (1993) wiesen nach, dass die Integrin Heterodimere  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  vom Mausembryo selbst exprimiert werden und zwar in der sehr frühen Entwicklungsphase. Eine spätere Expression von zusätzlichen  $\alpha$  Untereinheiten, erlaubt eine größere Vielfalt an Interaktionen mit ECM Proteinen vom Embryo selbst und natürlich zwischen Embryo und Uterus. So wurde die Ausschüttung von  $\alpha_2$ ,  $\alpha_6$  und  $\alpha_7$  im späten Blastozystenstadium vor der Implantation und  $\alpha_1$  mit dem Beginn der Implantation nachgewiesen (Sutherland et al. 1993). Diese Variation der Integrin Expression zwischen den einzelnen Tierarten, reflektiert Unterschiede zwischen den verschiedenen Typen der Apposition, Anheftung und Invasion während der Implantation.

## **1.6 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Unterschiede der placentären Lokalisation und Expression von Osteopontin in den unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien des Rindes darzustellen um Rückschluss ziehen zu können, ob OPN auch bei der Trächtigkeit des Rindes eine Rolle als Brückenligand zwischen luminalem Epithel und Trophoblast spielt.

Die Verteilung von OPN soll mit Paraffin- und Kryostatschnitten aus Rinderplazentomen verschiedener Trächtigkeitsstadien sowohl immunologisch als auch molekularbiologisch untersucht werden.

## II. MATERIAL und METHODEN

### 2.1 Material

Die Probenentnahme im Rahmen dieser Arbeit erfolgte am Gießener Schlachthof. Die gesunden Rinder waren unterschiedlichen Alters und in verschiedenen Stadien der Trächtigkeit. Die Graviditätsstadien wurden mit Hilfe der Scheitel-Steiss-Länge (SSL) des Fetus geschätzt (siehe Tabelle 1 und 2).

ALTER MONAT- ENDE	GEWICHT DER FRUCHT IN KG	SSL IN CM	AUFTRETEN DER BEHAARUNG	KÖRPERLICHE ENTWICKLUNG	PLAZENTA
1.	0,002	0,8-2,2	-	Kopf und Gliedmaßen erkennbar	Anlage vorhanden, mikrovilläre Adhäsion ab 20. Tag p.i.
2.	0,01-0,03	5,3	-	Kauanlage erkennbar, Gaumenspalte und Brustbein schließen sich	Plazentation im Gange, linsengroße Kotyledonen
3.	0,17-0,39	13	-	Hodensack, Euteranlage, Magenabteilungen erkennbar	Plazentare Verankerung vollständig
4.	0,8-1	24,5	Feine Haare am Augenbogen	Klauen abgesetzt und gelb gefärbt	Plazentome 6,5 : 3,5 : 2,0 cm
5.	1-3	32,5	An Augenbogen, Kinn, Lippen	Zitzen bilden sich aus, Hoden treten in den Hodensack	Plazentome 7,5 : 4,0 : 2,5 cm
6.	3-8	45	An Augenbogen, Kinn, Lippen, Augenlidern, Ohrtrand, Hornstellen, Schwanzspitze	Alle Organe angelegt, fortschreitendes Wachstum	Plazentome 8,0 : 4,5 : 2,5 cm
7.	8-15	56	An Extremitäten bis an Karpal- und Tarsalgelenke		Plazentome 11,0: 5,0:2,8 cm
8.	15-25	69	Vollständig, aber kurz behaart, Bauch- und Nabelhaar kurz und dünn		Plazentome 11,0: 6,0:3,5 cm
9.	20-45	81	Behaarung wird länger und vollständiger, auch an Hautnabel und Bauch		Plazentome 14,0 : 6,5 4,5 cm

**Tabelle 1:** Wachstum und Altersbestimmung beim Rinderfetus (nach Habermehl, 1975)

MATERIAL				METHODEN		
Rind	SSL des Fetus (cm)	Geschlecht des Fetus	Tag	Stickstoff	Bouin	4 % Formaldehyd
S 29	2,5	n. b.	ca. 30	x	x	
S 3	3,5	n. b.	ca. 30	x		x
S 9	6	n. b.	ca. 50	x	x	
S 18	7,3	n. b.	ca. 65	x	x	
S 7	10	w	ca. 80	x	x	
S 27	10,7	m	ca. 80	x	x	
S 26	10,8	m	ca. 80	x	x	
S 30	13,2	m	ca. 90	x	x	
S 11	13,7	n. b.	ca. 90	x	x	
S 20	14	m	ca. 100	x	x	
S 32	14,2	m	ca. 100	x	x	
S 23	17,2	w	ca. 100	x	x	
S 13	17,6	m	ca. 110	x	x	
S 34	20	w	ca. 110	x	x	
S 1	21,5	w	ca. 110	x		x
S 12	23,5	m	ca. 120	x	x	
S 10	24	m	ca. 120	x	x	
S 4	24,2	w	ca. 120	x	x	x
S 24	24,3	m	ca. 120	x	x	
S 17	31,5	w	ca. 140	x	x	
S 5	32,5	w	ca. 140	x	x	x
S 2	34	w	ca. 140	x		x
S 19	36,8	w	ca. 150	x	x	
S 15	44	w	ca. 150	x	x	
S 6	46	m	ca. 180	x	x	
S 8	47	m	ca. 180	x	x	
S 16	48	w	ca. 180	x	x	
S 14	50	w	ca. 180	x	x	
S 25	55,7	m	ca. 220	x	x	
S 28	58	m	ca. 220	x	x	
S 22	65,5	m	ca. 220	x	x	
S 21	65,9	w	ca. 220	x	x	
S 31	78	m	ca. 240	x	x	
S 33	96	w	ca. 270	x	x	

**Tabelle 2:** Verwendete Proben [*m/w* männlich/ weiblich, *n. b.* nicht bekannt]

### 2.1.1 Entnahme und Fixierung der Proben

Die Entnahme des Probenmaterials erfolgte direkt im Anschluss an die Schlachtung. Der Uterus wurde nach der Entblutung extirpiert. Das fruchttragende Uterushorn wurde entlang der Curvatura major eröffnet, der Embryo respektive Fetus entnommen und die SSL gemessen. Um eine Trennung von fetalem und maternalem Gewebe soweit wie möglich zu vermeiden, musste auf sorgfältige Behandlung geachtet werden. Unterschiedlich große Plazentome wurden mit einer Schere aus verschiedenen Bereichen des graviden Uterushorns entnommen und parallel in Bouin'scher Lösung fixiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Außerdem wurden Plazentome älterer Trächtigkeitsstadien mit Bouin'scher Lösung mittels einem Perfusionsbesteck (Vasuflo<sup>®</sup>, 0,65 x 19 mm, Dispomed<sup>®</sup>, Gelnhausen) über Äste der Aa. umbilicales perfusionsfixiert, wodurch das Blut aus dem fetalen Gefäßsystem der Plazentome herausgespült wurde. Die so fixierten Plazentome wurden anschließend in Bouin'scher Lösung 24 h nachfixiert. Von den frühen Stadien (<80 d) wurden die Uterushörner in toto entnommen und wiederum in Bouin'scher Lösung 4 h immersionsfixiert, anschließend in 0,5 cm breite Stücke geschnitten und in der gleichen Lösung ca. 24 h nachfixiert.

Die in Bouin'sche Lösung verbrachten perfusionsfixierten Plazentome wurden mit einem Skalpells in ca. 0,5 cm x 1 cm x 0,5 cm große, tortenstückähnliche Proben geschnitten (siehe Skizze) und routinemäßig in Paraffin eingebettet.

Die zunächst in flüssigen Stickstoff verbrachten Plazentome wurden bei -80°C gelagert. Die nativen Proben zur Verarbeitung am Gefriermikrotom wurden in 0,5 cm x 1 cm x 0,5 cm Stücke geschnitten, die in Aluminiumfolie verpackt bei -80°C tiefgefroren wurden.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Immunhistochemische Untersuchung**

#### **2.2.1.1 Kryostatschnitte und Fixation**

Geeignete Plazentomstücke wurden mit Tissue Tek<sup>®</sup> Gewebekleber (Sakura, Torrance, CA) auf Probenteller aufgeklebt und im Kryostat (Reichert und Jung, Nussloch) befestigt. Etwa 13µm dicke Gefrierschnitte wurden bei –22°C erstellt und direkt mit Chrom-Alaun beschichteten Objektträgern vom Messer abgehoben und bei Raumtemperatur (RT) 1 h getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 10 Sekunden (sec) in einer Lösung aus Aceton und Methanol [70 : 30] fixiert und kurz bei RT getrocknet.

#### **2.2.1.2 Immunhistochemisches Nachweisverfahren (Avidin-Biotin-Komplex, ABC Methode)**

Vorbehandlung der Gefrierschnitte:

Nach der Fixation wurde die endogene Peroxidase (Oxidoreduktasen), die bei jeder Entwicklung mit Peroxidase-Substraten zu einer Hintergrundreaktion führen würden, blockiert. Die Schnitte wurden dazu folgendermaßen behandelt:

- 10 min Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS gelöst bei RT
- 3 x 5 min spülen in PBS, bei RT
- 20 min Inkubation (Feuchte Kammer) 0,02 % BSA in PBS, bei RT.

Primärantikörper:

Die Primärantikörper LF-123 und LF-124 werden in einer Verdünnung 1/200 wie folgt eingesetzt.

- Inkubation in feuchter Kammer über Nacht mit einer Verdünnung von 1/200 bei +4°C
- Negativkontrollschnitte wurden mit Kaninchennormalserum 1/200 und parallel dazu mit PBS bei + 4°C inkubiert

Sekundärantikörper:

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Anti Maus/Anti Kaninchen Antikörper aus dem Pferd verwendet, der affinitätschromatographisch gereinigt war. Dieser war Bestandteil des Vectastain Universal ABC Elite Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, U.S.A.). Die Inkubationsschritte verliefen folgendermaßen:

- 3 x 5 min spülen in PBS, bei RT
- 20 min Inkubation (Feuchte Kammer) mit Sekundärantikörper bei RT (2,5 ml PBS + 50 µl BSA + 50 µl Sekundärantikörper)
- 3 x 5 min spülen in PBS, bei RT
- 45 min Inkubation (Feuchte Kammer) mit ABC Peroxidase-Komplex bei RT
- 3 x 5 min spülen in PBS, bei RT

Als Chromogen diente 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) Lösung (Vector Laboratories INC., Burlingame, U.S.A.), welche die Schnitte rot bis bräunlich anfärbt. Der Ansatz der Lösung erfolgt im Dunkeln.

- 5 ml Aqua dest. + 2 Tropfen Puffer Stammlösung + 3 Tropfen AEC Stammlösung + 2 Tropfen Wasserstoffperoxidlösung (alle aus Kit)
- 3 x 5 min spülen in Aqua dest, bei RT.
- 30 sek. gegenfärben mit Hämatoxylin
- 10 min mit Leitungswasser wässern
- Eindeckeln mit Kaisers Glyzeringelatine (Merck, OB 282670, Darmstadt)



### 2.2.1.3 Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop der Firma Leica (Wetzlar) mit einer Kamera (JVC KYF55B Color Kamera). Die Bilder wurden mit dem Programm dhs Bilddatenbank (Dietermann und Heuser Solution GmbH, Greifenstein-Beilstein) aufgenommen, digitalisiert und mit dem Programm CorelDraw8 bearbeitet.

### 2.2.2 Immunfluoreszenz

#### 2.2.2.1 Kryostatschnitte und Fixation

Siehe Kapitel 2.2.1.1

#### 2.2.2.2 Immunfluoreszenz Nachweisverfahren

Um Antikörper zu identifizieren, wurden Gewebsschnitte charakterisierter Substanzen als Antigen-Substrate verwendet. Im ersten Inkubationsschritt binden sich bei positiver Reaktion die nachzuweisenden Antikörper aus dem verdünnten Osteopontin Antiserum (im Kaninchen erzeugt) an die Festphasen-gebundenen Antigene. Im zweiten Inkubationsschritt werden diese Antikörper mit fluoreszeinmarkierten Esel Anti-Kaninchen Sekundärantikörpern sichtbar gemacht.

#### 1. Tag

- Gefrierschnitte 10 min in 100 %-igem Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixieren
- Methanol fixierte Schnitte lufttrocknen und kurz in PBS/Tween spülen
- Proteinblocklösung Esel Normalserum (Aurion, Code 900122, Wageningen, NL) 1:20 in Antikörper-Verdünnungspuffer verdünnen und ca. 60  $\mu\text{l}$  auf Schnitte geben

Die Blockierungslösung sollte aus der Tierart stammen, in der der Sekundärantikörper gewonnen wurde.

- 1 h Inkubation (Feuchte Kammer) bei RT
- Kurz in PBS/Tween spülen
- Primärantikörper OPN 123 und OPN 124 (1:200) mit Antikörper-Verdünnungspuffer verdünnen
- über Nacht Inkubation (Feuchte Kammer) bei 4°C

## 2. Tag

- 3 x 10 min in PBS/Tween spülen

### Die folgenden Schritte wurden im Dunkeln ausgeführt

- Sekundärantikörper Esel Anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert (Chemicon, AP182F, Temecula, USA) 1:200 in Antikörper-Verdünnungspuffer verdünnen
- 1 h Inkubation (Feuchte Kammer) bei RT
- 3 x 10 min in PBS/Tween spülen
- 1 x kurz in Aqua bidest spülen
- Eindeckeln mit Mowiol (Polysciences, Eppelheim)

### 2.2.2.3. Auswertung und Dokumentation

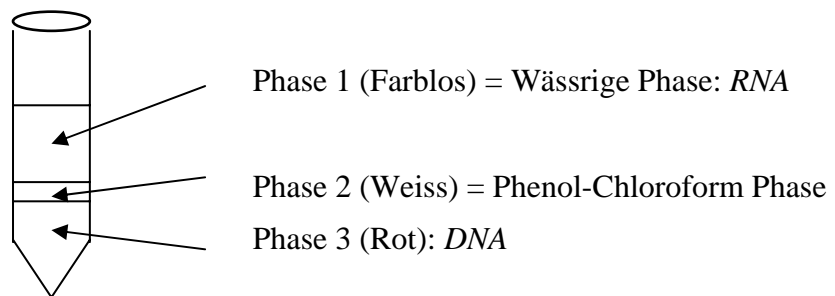
Die Schnitte wurden innerhalb von 4-5 Stunden im Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Wetzlar) untersucht. Zur Fotografie wurden Fuji Neopan 1600 ASA Filme verwendet.

### 2.2.3 RT-PCR

#### 2.2.3.1 Extraktion von mRNA und Protein aus schockgefrorenem Material

Plazentomgewebe wurde in einer Porzellanschale mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Etwa 120 mg Gewebe wurde in einem 2 ml Tube (Eppendorf) mit 1 ml Trizol Reagenz (Life Technologies, 15596-026, Karlsruhe) vermischt und mit dem Ultra-Turrax (IKA-Labortechnik, Karlsruhe) homogenisiert.

- 5 min bei RT stehen lassen
- 200 µl Trichlormethan (Fa. Roth, 3313.1, Karlsruhe) zugeben und vortexen
- 5 min bei RT stehen lassen
- 15 min bei 4°C und 18.000 U/min zentrifugieren



#### RNA Isolation

Präzipitation:

- Abpipettieren der obersten, wässrigen Phase (mRNA)
- Gleiche Menge Isopropanol hinzufügen
- 30 min bei -20°C inkubieren
- 10 min bei 4°C und 18.000 U/min zentrifugieren

Waschen:

- Überstand verwerfen
- Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol in –20°C Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser lösen
- 10 min auf Eis geben
- 10 min bei 4°C und 18.000 U/min zentrifugieren

Diesen Schritt 1 x wiederholen

Resuspendieren:

- Überstand verwerfen
- Pellet 30-60 min bei 37°C trocknen
- bei 70°C in 50 µl DEPC resuspendieren

Die Lagerung erfolgt bei –80°C in flüssigem Stickstoff

Protein-Isolation

- Abpipettieren der unteren roten Phase
- 1,5 ml Isopropylalkohol hinzufügen, kurz vortexen (Reax Control, Heidolph, Schwalbach)
- 10 min bei RT stehen lassen
- Vortexen
- 10 min bei RT stehen lassen

Waschen:

- Überstand verwerfen
- Mit 2 ml 95 %igem Ethanol und 0,3 M Guanidinhydrochlorid (Sigma, G-4505, München) Pellets lösen
- Vortexen
- 20 min bei RT stehen lassen
- Vortexen
- 5 min bei 4°C und 12.000 U/min zentrifugieren

Den Waschvorgang 3 x wiederholen.

- Pellet in 2 ml 70 %igem Ethanol lösen
- Vortexen
- 20 min bei RT stehen lassen
- Vortexen
- 5 min bei 4°C und 12.000 U/min zentrifugieren

Resuspendieren:

- Überstand verwerfen
- Pellet trocknen bei 37°C 20 min
- Resuspendieren bei 70°C in 1 %igem SDS (Natriumdodecylsulfat; Sigma, L-4390, München)
- 10 min bei 4°C und 12.000 U/min zentrifugieren
- Pellet verwerfen
- Überführung des Überstandes in neue Tubes

Die Proteine wurden bei –20°C gelagert

#### 2.2.3.2 Agarose-Gel-Elektrophorese (RNA-Gel)

Die einfachste Möglichkeit ein Amplikon nachzuweisen, ist die Gel-Elektrophorese. Mit ihr hat man die Möglichkeit, kleine Mengen des PCR Amplifikates aufzutrennen und die Banden durch Zugabe von Ethidiumbromid (einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert) und eine UV-Bestrahlung sichtbar zu machen.

##### 50 ml Ansatz

- 1 g Agarose (Appligene LOT#2510) (2 %) in 43,5 ml Aqua bidest. lösen
- In der Mikrowelle aufkochen bis keine Schlieren mehr vorhanden sind
- Abkühlen
- 5 ml 20 x MOPS (Sigma, M-1254, München)
- 1,5 ml 37 %iges Formalin
- 5 µl Ethidiumbromid (Sigma, E-1385, München) zugeben
- Das Gel blasenfrei in einen Elektrophorese-Schlitten gießen
- Mit einem Kamm die Taschen (Slots) für das PCR Produkt formen.

<b>Probe</b>	<b>Marker</b>
5 µl RNA	2 µl eines 100 bp Markers (Promega, G2101, Mannheim)
5 µl Aqua bidest	8 µl Aqua bidest
2 µl Loading Buffer	2 µl Loading Buffer

Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Gel entfernt und die Gelkassette in die Elektrophoreseapparatur (Mini-Protean 3<sup>®</sup> Electrophoresis Cell System; Bio-Rad, München) eingebaut.

- Die Elektrophoreseapparatur mit Running Buffer auffüllen bis das Gel komplett bedeckt ist.
  - 12 µl je Probe vorsichtig in die Slots pipettieren
  - Elektrophorese bei 125 V Spannung und 1 cm Elektrodenabstand 25 min
- DNA wandert von – nach +  
Ethidiumbromid wandert von + nach –

#### 2.2.3.3 Auswertung und Dokumentation

Das Gel wurde auf einem High Performance Ultraviolett Transilluminator (Fa UVP, Upland, CA) gelegt und mittels einer Electrophoresis Hood (0,8 Vergrößerung, Fa Polaroid) und mit einer Gel Cam (Fa Polaroid) (Blende 16, Belichtung ½ sec) fotografisch dokumentiert.

#### 2.2.3.4 Erststrang Synthese (cDNA)

Nach folgendem Protokoll wurde die gewonnene mRNA (siehe Punkt 2.2.2.1) mittels Reverser Transkriptase (Superscript II Reverse Transkriptase, Gibco BRL, Gaithersburg, USA, 18064-014) in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben.

Die isolierte mRNA wurde photometrisch gemessen und so der mRNA-Gehalt des tiefgefrorenen Plazentagewebes bestimmt. Aus diesem ergibt sich die zu verwendende Menge mRNA in  $\mu\text{l}$  und die Menge DEPC-Wasser in  $\mu\text{l}$ . In einem Ansatz von 20  $\mu\text{l}$  sollen 8  $\mu\text{l}$  mRNA enthalten sein.

Die verwendete Menge ergibt sich nach folgender Rechnung:

Photometerergebnis : 1000 = X

8 (Menge des gewünschten cDNA-Gehaltes): X = Menge mRNA

##### 20 $\mu\text{l}$ Ansatz

- 8  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser (Differenz zu 12  $\mu\text{l}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  Primer Oligo dT-15 (Promega, Mannheim)
- 3  $\mu\text{l}$  RNA
- 10 min bei 70°C stehen lassen
- 3 min im Eiswasser abkühlen
- 4  $\mu\text{l}$  5x first strang buffer (Gibco BRL, 18064-014, Gaithersburg, USA)
- 2  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT (Dithioreitol) (Gibco, 18064-014, Gaithersburg, USA)
- 1  $\mu\text{l}$  mM dNTP
- 1 min bei 37°C stehen lassen
- 1  $\mu\text{l}$  Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL, 18064-014, Gaithersburg, USA)
- 1 h bei 37-42°C Inkubation zur Bildung der cDNA
- Lagerung der cDNA bei – 20°C

### 2.2.3.5 PCR

Mit Hilfe der PCR ist eine Amplifikation von cDNA-Sequenzen für Osteopontin möglich. Die erforderlichen Primer wurden anhand von mRNA Sequenzen aus der Nucleotide Datenbank von PubMed ausgewählt und anschließend von der Firma MWG-Biotech AG in Ebersberg hergestellt.

Primer: Osteopontin 333 Basenpaare

F1 (vorwärts)	5'CGAGGTGATAGTGTGGCTTACG3'
R1 (rückwärts)	5'TCAGGTGTTTGTCTTCTTCACTCT3'

Vor Versuchsbeginn müssen alle Reagenzien und Geräte desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert werden. Der Arbeitsplatz ist mit RNase-free (Continental Laboratory Products, 401134, San Diego, USA,) gegen RNasen zu behandeln.

Es werden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen verwendet.

#### 50 µl Ansatz

- 38,5 µl DEPC-Wasser
- 5 µl 10x PCR-Puffer (Perkin Elmer, N8080241, Boston)
- 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung (Perkin Elmer, N8080241, Boston)
- 1 ml 10 mM dNTP (Perkin Elmer, N8080007, Boston)
- 1 µl 5'Primer (10 pmol) forward/reverse
- 1 µl 3'Primer (10 pmol) forward/reverse
- 1 µl cDNA
- 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (Perkin Elmer, N8080241, Boston)



Um die cDNA zu vervielfältigen müssen die Proben mehrere Zyklen bei unterschiedlicher Temperatur durchlaufen.

1. Die komplementären Stränge einer doppelsträngigen Nukleinsäure werden getrennt (=>DENATURIERUNG).
2. Die Primer binden an die denaturierte Matrize, dabei entsteht ein Doppelstrang, der über Wasserstoffbrücken stabilisiert wird (=>ANNEALING)
3. Eine hitzestabile DNA-Polymerase bindet an den Primer, liest den verbleibenden DNA-Einzelstrang in 5`- 3`` Richtung ab und baut die entsprechenden Nukleotide aneinander. Somit wird ein neuer DNA-Strang gebildet (=>ELONGATION)

Die DNA-Stränge werden innerhalb jedes Zyklus verdoppelt. Die Proben wurden in einem Thermocycler (T3, Biometra, Göttingen) mit dem folgenden Programm bearbeitet:

Heizdeckeltemperatur: 95°C

Schleife: Schritt 2-4  $\Rightarrow$  40x

Schritt 1  $\Rightarrow$  95,0°C     3 min 0 sec

Schritt 2  $\Rightarrow$  95,0°C     1 min 0 sec

Schritt 3  $\Rightarrow$  63,0°C     1 min 0 sec

Schritt 4  $\Rightarrow$  72,0°C     2 min 0 sec

Schritt 5  $\Rightarrow$  72,0°C    10 min 0 sec

Schritt 6  $\Rightarrow$  4,0°C            Pause

Die Schmelztemperatur wurde nach folgender Formel aus den Nukleinsäuren (Adenosin, Thymin, Guanodin und Cytidin) berechnet:

$$T_M = (A + T) \times 2^\circ\text{C} + (G + C) \times 4^\circ\text{C}$$

Die Anlagerungstemperatur ergab sich aus:

$$T_A = T_M - 5^\circ\text{C}$$

Somit ergab sich folgende Schmelz- und Anlagerungstemperatur für OPN

Schmelztemperatur: 72°C

Anlagerungstemperatur: 63°C

#### 2.2.3.6 Agarose-Gel-Elektrophorese (DNA-Gel)

Amplifizierte PCR Produkte werden mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesen. Hiermit werden die PCR Produkte aufgetrennt und die Banden durch Zugabe von Ethidiumbromid und eine UV-Bestrahlung sichtbar gemacht.

##### 50 ml Ansatz

- 1 g Agarose (Appligene LOT#2510) (2 %) in 50 ml 1 x TAE lösen
- In der Mikrowelle aufkochen bis keine Schlieren mehr erkennbar sind
- Abkühlen
- 10 µl Ethidiumbromid (Sigma, E-1385, München) zugeben
- Das Gel blasenfrei in einen Elektrophorese-Schlitten gießen
- Mit einem Kamm die Taschen (Slots) für das PCR Produkt formen.

##### Loading Buffer

- 0,05 g Bromphenolblau (Sigma, B-6131, München)
- 0,05 g Xylencyanol
- 3 g Ficoll 400 (Sigma, F-4375, München)
- 3 ml 0,5 M EDTA

Auf 20 ml mit 1 x TAE auf und dann filtrieren.

##### Running Buffer 1 x TAE

- 48,4 g TRIS
- 11 ml Essigsäure
- 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,4

Auf 1 Liter mit Aqua bidest auffüllen

<b>Probe</b>	<b>Marker</b>
6 µl PCR-Produkt	2 µl eines 100 bp Markers (Promega, G2101)
4 µl Aqua bidest	8 µl Aqua bidest
5 µl Loading Buffer	5 µl Loading Buffer

Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Gel entfernt und die Gelkassette in die Elektrophoreseapparatur (Mini-Protean 3® Electrophoresis Cell-System; Bio-Rad, München) eingebaut.

- Die Elektrophoreseapparatur mit Running Buffer auffüllen, bis das Gel komplett bedeckt ist.
  - 15 µl je Probe vorsichtig in die Slots pipettieren
  - Elektrophorese bei 125 V Spannung und 1 cm Elektrodenabstand 25 min
- DNA wandert von – nach +  
Ethidiumbromid wandert von + nach –

#### 2.2.3.7 Auswertung und Dokumentation

Siehe Kapitel 2.2.3.3

## 2.2.4 RNA in situ Hybridisierung mit digoxigenin-markierten RNA-Sonden

### 2.2.4.1 Herstellung von DIG-markierten Sonden

Die cRNA Sonden zur Hybridisierung wurden im Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität nach folgendem Schema aus dem RT-PCR Produkt hergestellt.

#### Klonierung:

- Ligation von Plasmid (pGEM-T) und Insert (PCR-Produkt)
- Transformation von Plasmid (mit Insert) in *E. coli* XL1-Blue
- Plasmid Extraktion
- Doppelverdau und DNA Agarose Gel
- Restriktions-Endonuklease-Verdauung (Linearisierung der 5'-Enden)
- 2 x Einzelverdauung mit Restriktionsenzymen NCO I und NOT I, zur Herstellung von der identischen Sense und der komplementären Anti-Sense Sonde
- DNA Agarose Gel

#### In-vitro Transkription von DIG-cRNA:

- Umschreiben der DNA in cRNA
- Markieren der cRNA Sequenzen mit DIG-RNA-Labeling-Mix

Um die erzeugten Sequenzen mit den ursprünglichen zu vergleichen, wurde die Identität dieser Gen-Stücke durch Sequenzierung geprüft und bestätigt (Qiagen Sequenzier Service).

#### 2.2.4.2 In situ Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung ist eine aussagekräftige Methode, um sowohl DNA- als auch RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen zu lokalisieren.

Behandlung der Paraffinschnitte:

Mit einem Mikrotom (Firma Leica, Wetzlar) wurden etwa 3µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden vorsichtig vom Messer abgehoben, in einem Wasserbad bei 37°C gestreckt und auf 3-Aminopropyltriethoxysilane (APES) beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden 24 h bei 37°C im Trockenschrank getrocknet.

Vorbereitungen am Vortag:

- 3 µm dicke Paraffin-Schnitte in einen Trockenschrank bei 60°C stellen
- Xylol in den Trockenschrank bei 60°C stellen

##### 1.Tag

Vorbereitung:

Entparaffinieren und Entwässern:

- Paraffinschnitte 5 min in Xylol (Trockenschrank) stellen
- 2 x 5 min Xylol, RT
- 2 x 5 min 96 %iges Ethanol, RT
- 1 x 5 min 70 %iges Ethanol, RT

Für die nun folgenden Schritte wurden ausschließlich sterile Behälter, sterile Bestecke und autoklavierte Lösungen verwendet, um eine RNase Kontamination einzuschränken. Die Sterilisation der Instrumente wurde 4 Stunden bei 180°C in einem Heißluft-Sterilisator (Heraeus, Rabenau) vorgenommen.

## MATERIAL und METHODEN

- 1 x 5 min steriles DEPC-Wasser, RT
- 1 x 20 min 0,2N HCl, RT
- 15 min in 2 x SSC bei 70°C spülen
- 5 min in PBSM spülen
- Inkubation mit Proteinase K (Sigma, P-2308, München) in feuchter Kammer bei 37°C
- 5 min in 0,2 %ige Glyzin-Lösung spülen, Standküvette
- 15 min in 20 %ige Essigsäure bei 4°C spülen, Standküvette
- 1 x 5 min in PBSM spülen
- 10 min in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung spülen, Standküvette
- 1 x 5 min in PBSM spülen

### Prähybridisierung:

- 30 min 20 %iges Glycerol (Sigma, G-5516, München) in DEPC-Wasser

### Hybridisierung:

SONDEN-GEMISCH		
Substanz	Sense	Antisense
DEPC-Wasser	4 µl	4 µl
Salmon sperm DNA (1 mg/ml) (Sigma, D-7656)	4 µl	4 µl
Yeast t-RNA (1 mg/ml) (Sigma, R-8508)	8 µl	8 µl
DIG-cRNA (Sonde)	4 µl	4 µl

HYBRIDISIERUNGS-PUFFER		
Substanz	Sense	Antisense
DEPC-Wasser	56 µl	56 µl
20x SSC (2x)	40 µl	40 µl
50 % Dextransulfat (10 %) auf 70°C erhitzen	80 µl	80 µl
Denhardt-Reagenz (BFP; 1x) (Sigma, D-2532)	4 µl	4 µl
Deionisiertes Formamid (50 %) (Sigma, F-9037)	200 µl	200 µl

- Schnitte kurz in 2x SSC tauchen
- 10 min auf Heizplatte 70°C legen, dann auf Kühlakku abschrecken
- Sondengemisch 10 min in Wasserbad bei 70°C stellen, dann im Eiswasser abschrecken
- Sondengemisch und Hybridisierungspuffer zusammen pipettieren und auf den Schnitt geben (ca. 50 µl pro Schnitt)
- Inkubation (Feuchte Kammer mit 50 % Formamid in 2x SSC) über Nacht, bei 37°C

## 2. Tag

### Posthybridisierung:

- 3 x 15 min in 4x SSC spülen
- Inkubation (Feuchte Kammer) 1,35 ml 4x SSC + 150 µl 10x RNaseA/RNaseT1 Stammlösung (Boehringer, 109193, Mannheim) 30 min bei 37°C

Stringentes Waschen zur Ablösung nicht perfekt gepaarter Hybridmoleküle ist erforderlich, um unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden.

- 4 x 5 min in 4x SSC spülen bei 37°C
- 15 min in 2x SSC spülen bei 60°C
- 15 min in 0,2x SSC spülen bei 42°C
- 5 min in 0,1x SSC spülen bei RT
- 5 min in 2x SSC spülen bei RT

### Immunhistochemie:

- 10 min in 1x TNMT spülen bei RT
- 1 h 3 % BSA in 1x TNMT spülen bei RT
- 10 min in 1x TNMT spülen bei RT
- Inkubation (Feuchte Kammer) 666 µl 1x TNMT + 333 µl 3 % BSA in 1x TNMT + 2 µl Anti-DIG-Fab-Antikörper (Rabbit F(ab') Anti-DIG/HRP P-5104) (1:500) über Nacht bei 4°C

3. Tag

- 2 x 10 min in 1x TNMT spülen
- 5 min in 1x NTB spülen
- 5 min in 1x NTB + 1 ml 1 M Levamisol (Sigma, 9756, München) spülen
- Inkubation (Feuchte Kammer) bei RT

Die Reaktion wurde am nächsten morgen nach folgendem Protokoll abgestoppt.

- 5 min in 1x NTB + 1 ml 1 M Levamisol spülen
- 5 min in Aqua bidest. spülen
- Eindeckeln mit Kaisers Glyzeringelatine (Merck, OB 282670, Darmstadt)

2.2.4.2 Auswertung und Dokumentation  
siehe Kapitel 2.1.2.3



### **III. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Allgemeines zur Erfassung der immunhistochemischen Methoden**

Immunhistochemisch zeigte sich eine positive Reaktion der Primärantikörper anti Osteopontin (OPN) LF-123 und LF-124 durch Ausprägung einer rotbraunen Färbung. Eine Quantifizierung von immunhistochemischen Färbungen ist grundsätzlich fragwürdig, daher wurden nur Gefrierschnitte aus denselben immunhistochemischen Durchgängen miteinander verglichen. Die Schnitte von verschiedenen Durchgängen zeigten zwar einheitliche und vergleichbare Färbungen, in einigen Fällen variierte jedoch die Gesamtintensität der Färbung. Zusammenhangstrennungen zwischen fetalem und maternalem Epithel waren regelmäßig zu beobachten und als Präparationsartefakte zu betrachten.

Positive Immunreaktionen in der Immunfluoreszenz, das heißt also die Anlagerung von fluoreszeinmarkierten Sekundärantikörpern (Esel Anti-Kaninchen) an die Primärantikörper LF-123 und LF-124, wurde durch UV Lichtanregung in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Die Fluoreszenz war, wie bei der Immunhistochemie oben beschrieben, variabel. Ein direkter Vergleich verschiedener Immunfluoreszenzfärbungen konnte aus technischen Gründen nicht stattfinden, weil die grün-gelbe Färbung der Immunfluoreszenz bei längerer UV-Anregung an Intensität verlor, beziehungsweise nach 2-3 Wochen zurückging.

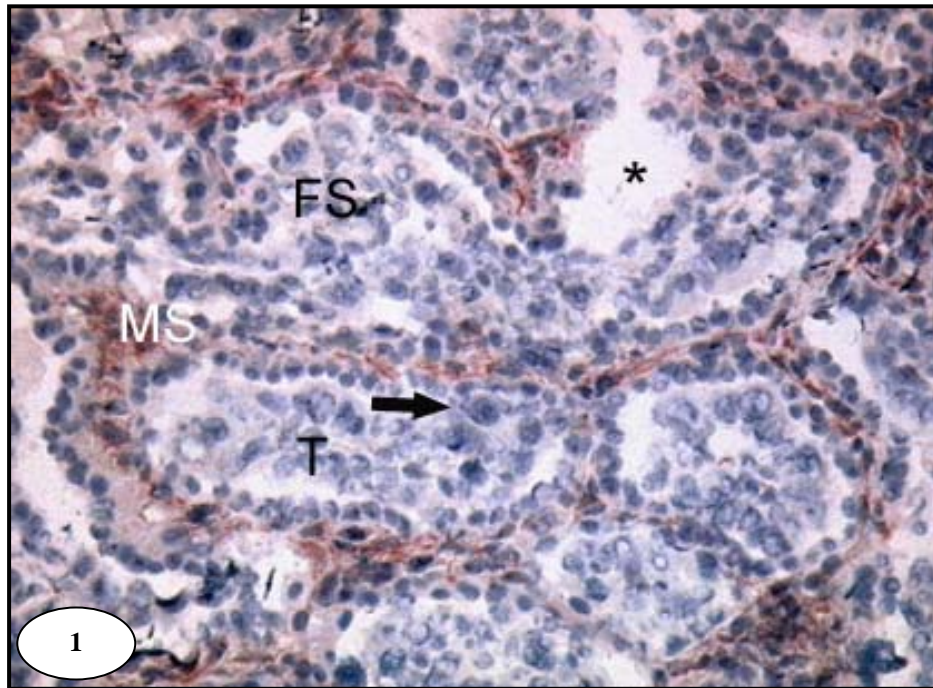
## **3.2 Lokalisation von OPN Protein in der Rinderplazenta**

### **3.2.1 Osteopontin LF-123 und LF-124 in der Immunhistochemie**

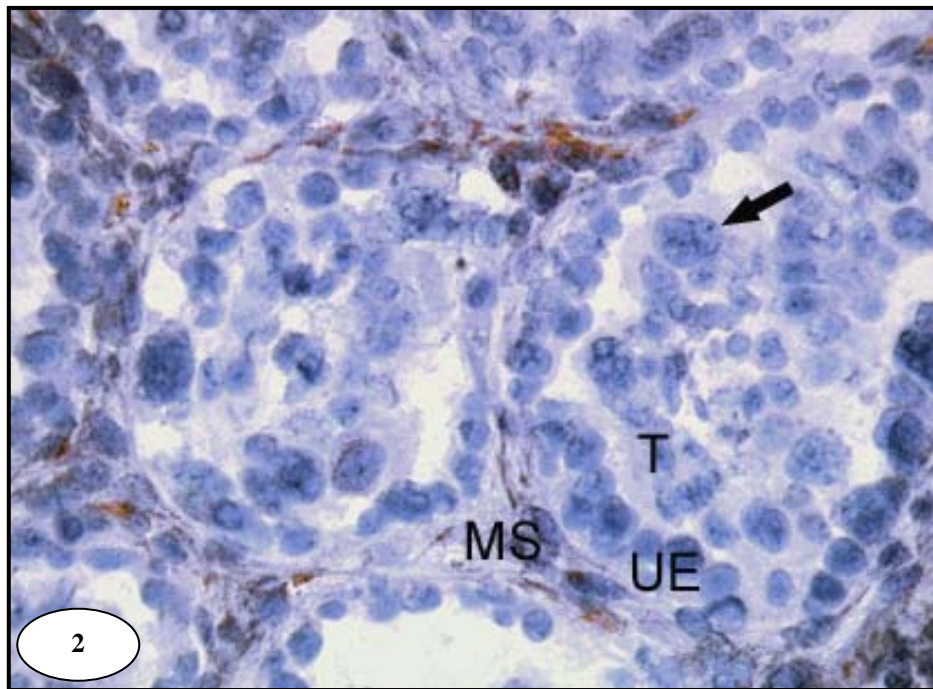
Eine Immunreaktion der Osteopontin Antikörper LF-123 und LF-124 war in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien identisch. Plazentomär war eine starke, meist gefäßassoziierte Immunreaktion im maternalen Stroma zu finden (Abbildungen 1-4). Im plazentomären fetalen Mesenchym zeigten ausschließlich Endothelien eine Immunfärbung für Osteopontin, während Trophoblastzellen infranukleär eine schwache Immunfärbung aufwiesen (Abbildungen 3 und 4). Dagegen war interplazentomär apikal im Chorionepithel sowie im Uterus- oder Karunkelepithel eine starke Immunreaktion festzustellen (Abbildungen 5 und 6). Auffällig war, dass beide Antikörper eine starke Affinität zu den Zellen fetaler Gefäßwände und zum maternalen Stroma besitzen.

### **3.2.2 Osteopontin LF-123 und LF-124 in der Immunfluoreszenz**

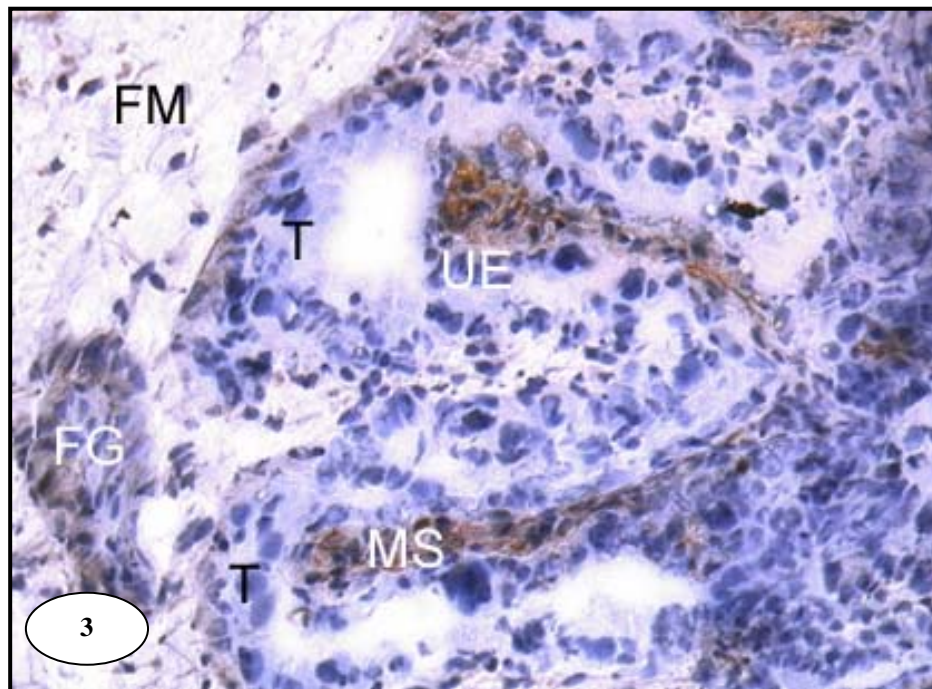
Plazentomär zeigte sich in der Immunfluoreszenz eine starke Immunreaktion in den Trophoblastzellen und ein schwächeres Signal im maternalen Stroma (Abbildung 9). Interplazentomär konnte eine starke Immunfärbung apikal in den Zellen der uterinen Drüsen nachgewiesen werden (Abbildung 11). Wie bei der Immunhistochemie erzeugten die Osteopontin Antikörper LF-123 und LF-124 ein starkes gefäßassoziiertes Signal (Abbildung 10).



**Abbildung 1:** Immunhistochemischer Nachweis von OPN (LF-123), circa 140. Tag post inseminationem (p.i.): Übersichtsaufnahme aus dem Zentrum des Plazentoms. Die Immunreaktion ist in erster Linie im maternalen Stroma (**MS**) zu erkennen. Fetales Stroma (**FS**), Trophoblast (**T**), Trophoblastriesenzelle (**Pfeil**), Künstliche Spalträume (\*). Vergrößerung: 200-fach .

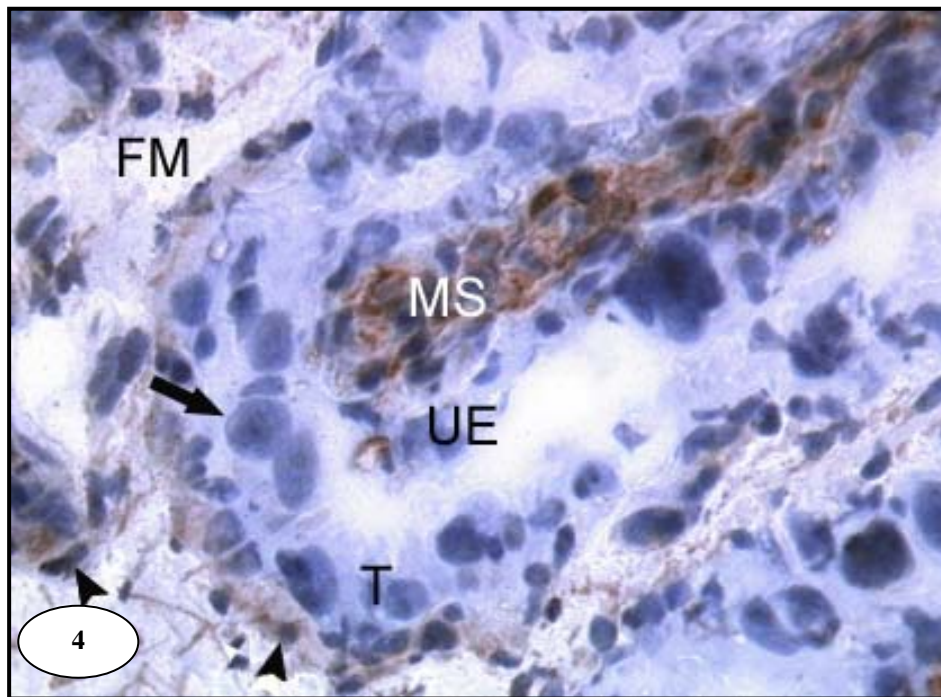


**Abbildung 2:** Immunhistochemischer Nachweis von OPN (LF-123), circa 140. Tag p.i.: Detail aus dem Zentrum des Plazentoms mit quer angeschnittenen fetalen Zotten. Eine Immunreaktion zeigte sich ausschließlich im maternalen Stroma (**MS**). Trophoblast (**T**), Trophoblastriesenzelle (**Pfeil**) Uterusepithel (**UE**). Vergrößerung: 400-fach.

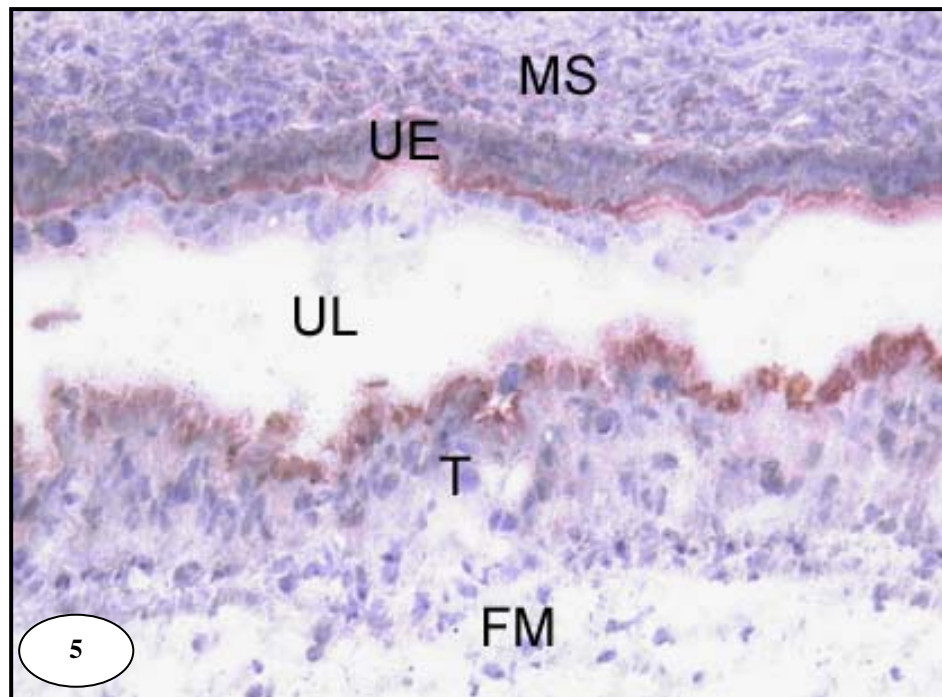


**Abbildung 3:** Immunhistochemischer Nachweis von OPN (LF-124), circa 100. Tag p.i.: Übersichtsaufnahme der Chorionplatte mit zwei maternalen Septenspitzen. Es ist ein starkes Signal im maternalen Stroma (**MS**) und ein schwaches Signal in den Endothelien unterhalb des Trophoblastepithels (**T**) zu beobachten. Ein großes fetales Gefäß (**FG**) im fetalen Mesenchym (**FM**) des Allantochorions zeigt eine deutliche Immunreaktion in der Gefäßwand. Uterusepithel (**UE**). Vergrößerung: 200-fach.

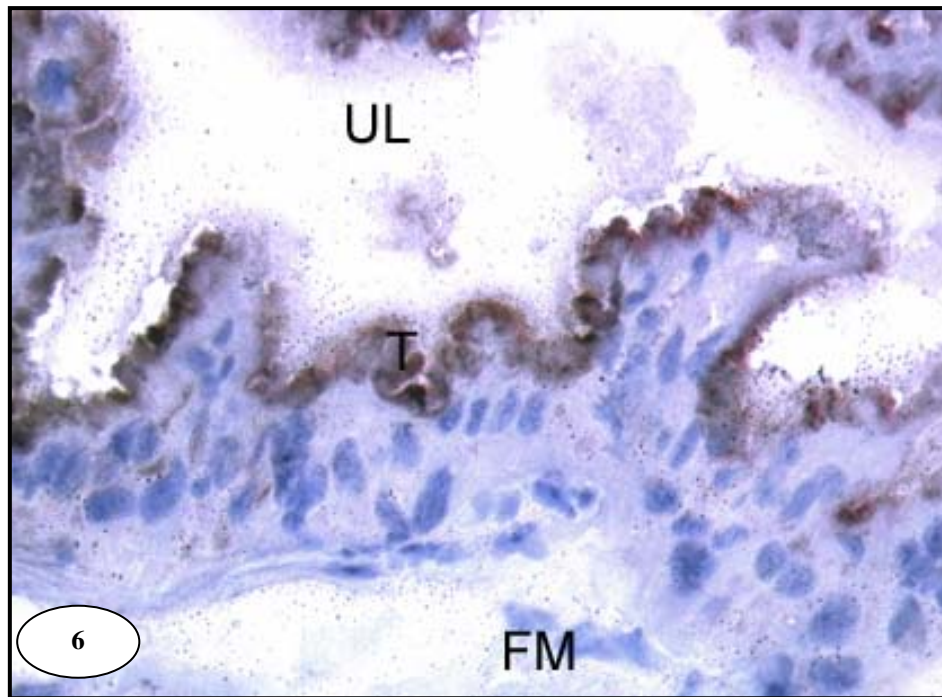




**Abbildung 4:** Immunhistochemischer Nachweis von OPN (LF-124), circa. 100. Tag p.i.: Spitze eines maternalen Septums. Das maternale Stroma (**MS**) der Septenspitze zeigt eine besonders starke Immunreaktion. Weiterhin ist eine Immunfärbung in den Gefäßendothelien des fetalen Mesenchyms (**FM**) zu beobachten (**Pfeilspitzen**). Trophoblastriesenzellen (**Pfeil**), Uterusepithel (**UE**). Vergrößerung 400-fach.

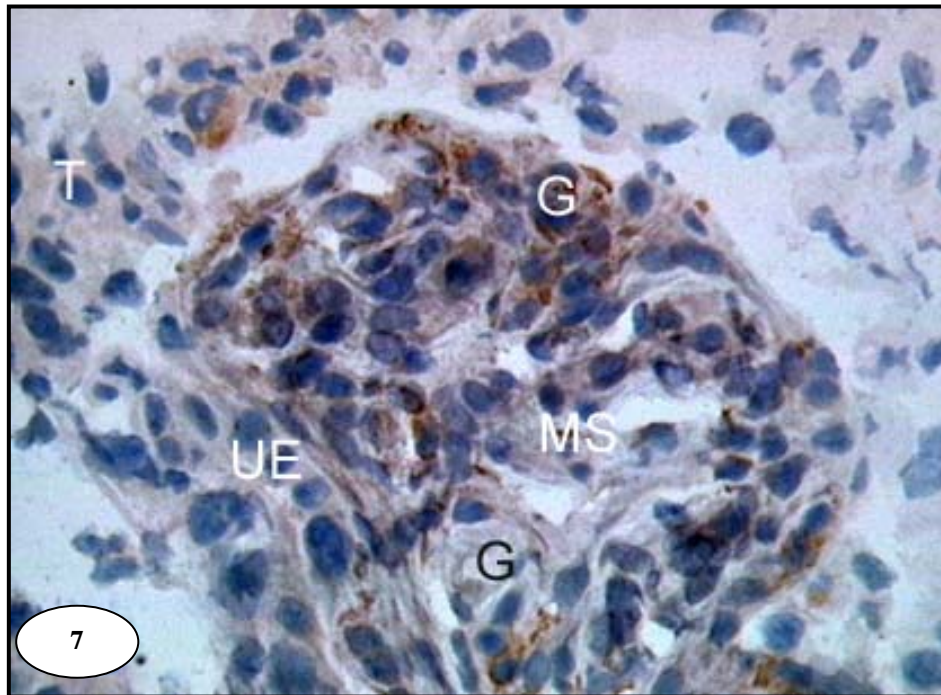


**Abbildung 5:** OPN (LF-123) Immunhistochemischer Nachweis, circa 100. Tag p.i.: Interplazentomärer Bereich. Die Trophoblastzellen (**T**) und das Uterusepithel (**UE**) zeigen apikal eine starke Immunreaktion. Fetales Mesenchym (**FM**), Maternales Stroma (**MS**), Uteruslumen (**UL**). Vergrößerung: 200-fach.

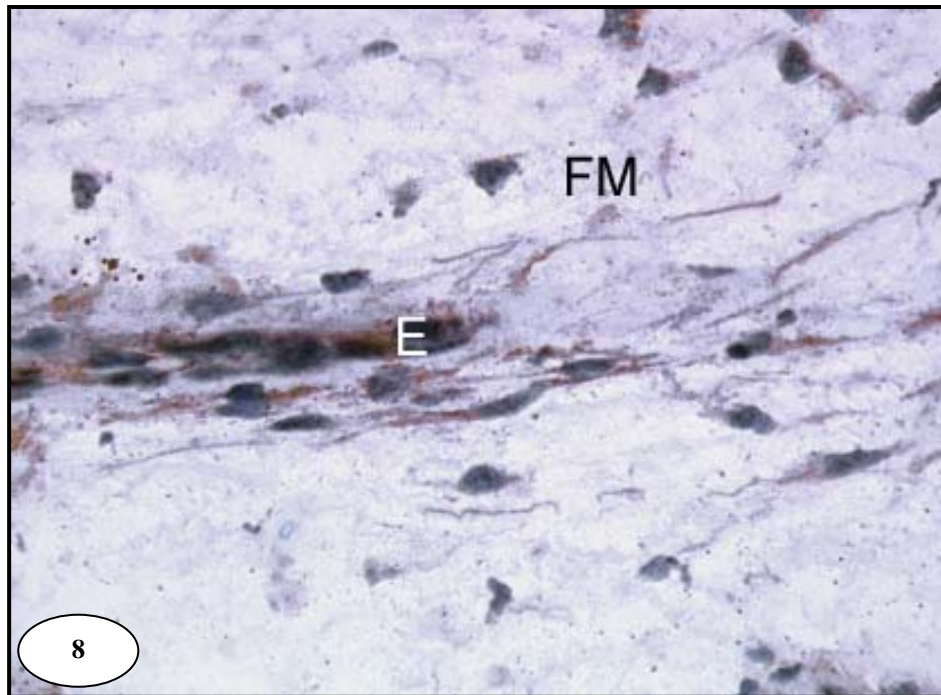


**Abbildung 6:** Immunhistochemischer Nachweis von OPN (LF-123), circa 100. Tag p.i.: Interkotyledonärer Bereich. Die interplazentomären Trophoblastzellen (T) weisen apikal eine starke Immunreaktion auf. Fetales Mesenchym (FM), Uteruslumen (UL). Vergrößerung: 400-fach.

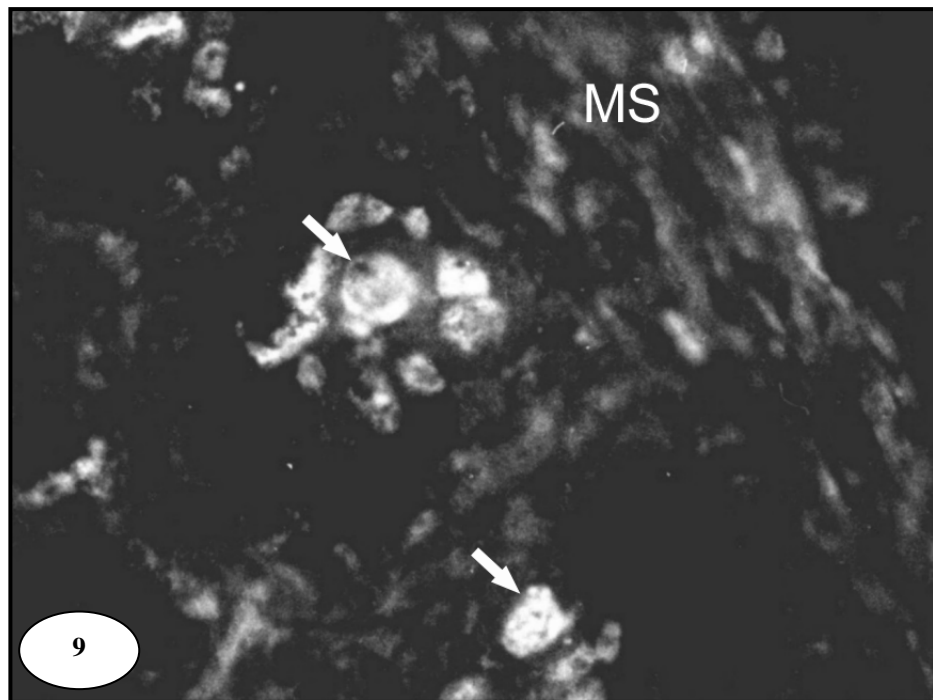




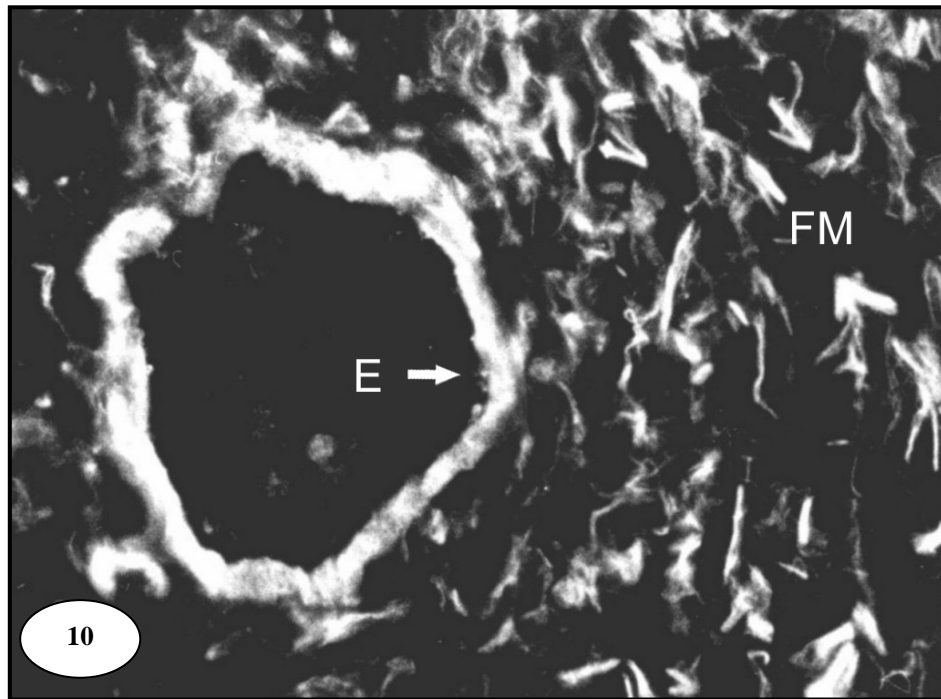
**Abbildung 7:** Immunhistochemischer Nachweis von OPN (LF-123), circa 140. Tag p.i.: Maternale Septenspitze, längs geschnitten. Im maternalen Stroma (**MS**), besonders im Bereich der Endothelien wird eine starke Immunreaktion beobachtet. Auch im Trophoblasten (**T**) zeigt sich eine positive Reaktion. Maternale Gefäße (**G**), Uterusepithel (**UE**). Vergrößerung 400-fach.



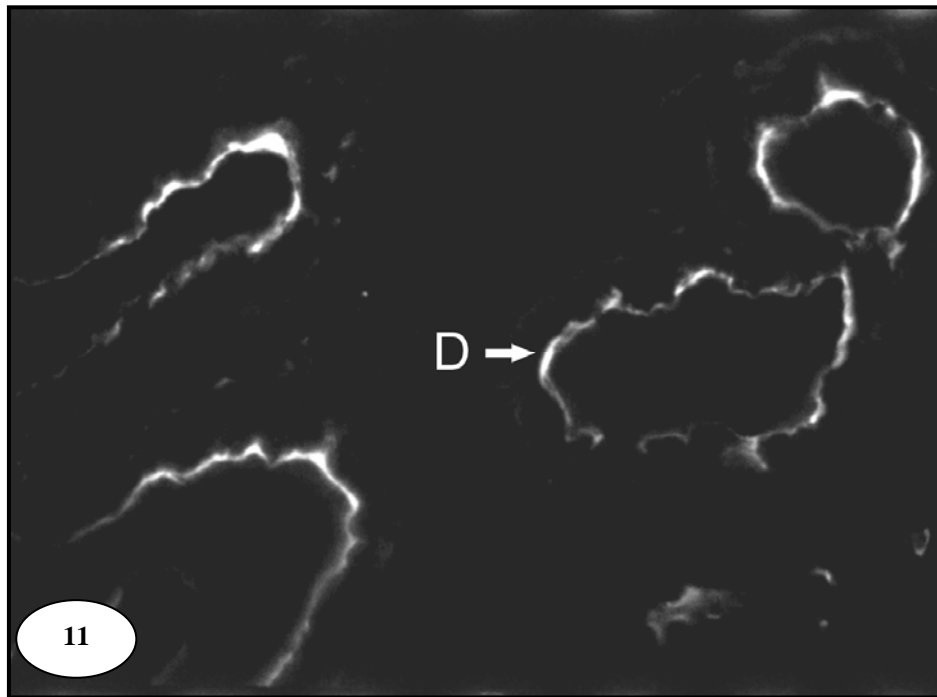
**Abbildung 8:** Immunhistochemischer Nachweis von OPN (LF-123), circa Tag 220 p.i.: Detail aus dem fetalen Mesenchym (FM) einer Stammzotte. Das Gefäßendothel (E) und Zellen der zugehörigen Gefäßwand zeigen eine starke Immunreaktion, während das umgebende fetale Mesenchym (FM) nur sehr schwach gefärbt ist. Vergrößerung: 400-fach.



**Abbildung 9:** Nachweis von OPN (LF-124) durch Immunfluoreszenz, circa 120. Tag der Gravidität: Zentrum des Plazentoms. Die Trophoblastzellen (**Pfeil**) zeigen eine deutliche Fluoreszenz, wohingegen ein etwas schwächeres Signal im maternalen Stroma (**MS**) auftritt. Vergrößerung 400-fach.



**Abbildung 10:** OPN (LF-124) Immunfluoreszenzaufnahme aus dem Bereich der Chorionplatte, circa 120. Tag der Gravidität. Eine starke Immunfluoreszenz wird im fetalen Mesenchym (**FM**) und in den Gefäßendothelien (**E**) fetaler Gefäße beobachtet. Vergrößerung: 400-fach.

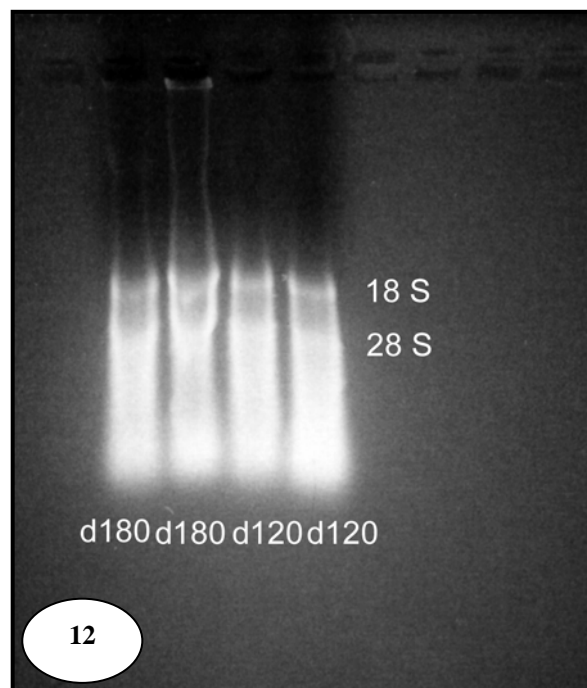


**Abbildung 11:** OPN (LF-124) Nachweis durch Immunfluoreszenz, circa 120. Tag der Gravidität. Interplazentomäres Gewebe: Ein deutliches Fluoreszenzsignal findet sich apikal in den Zellen der uterinen Drüsen (**D**). Vergrößerung: 400-fach.

### 3.3 Nachweis von OPN mittels molekularbiologischer Methoden

#### 3.3.1 Isolation von m-RNA

Die Menge und die Qualität der isolierten RNA wurden mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Zwei diskrete Banden für die Ribosomenproteine 18 S und 28 S rRNA in der Gelelektrophorese zeigten eine intakte Präparation an.

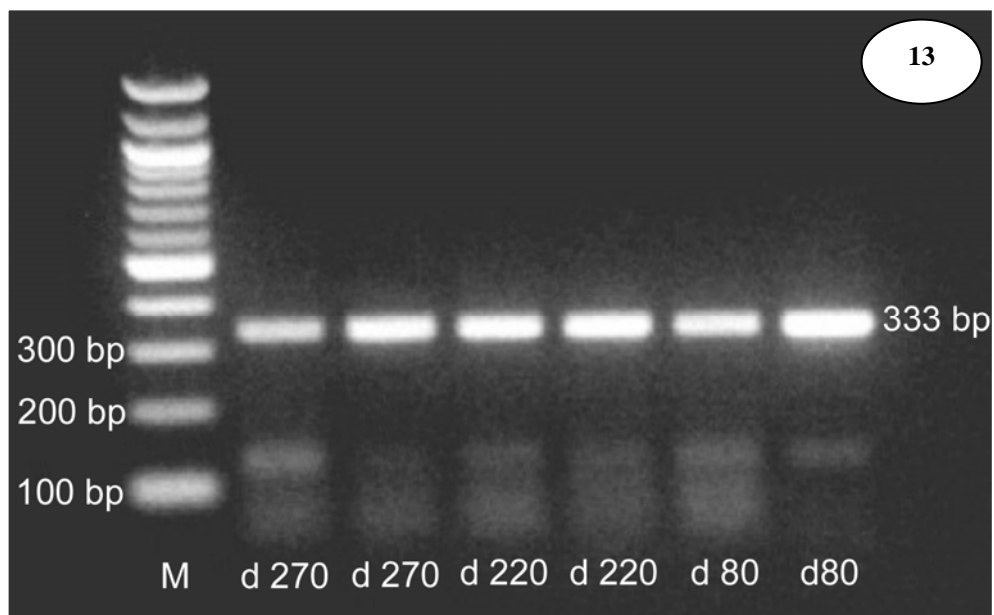


**Abbildung 12:** Intakte RNA Isolierung am Tag (d) 120 und 180 der Trächtigkeit, gekennzeichnet durch S18 und S28 ribosomales Protein.

### 3.3.2 RT-PCR

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase (RT)-PCR wurden spezifische RNA-Sequenzen für Osteopontin amplifiziert.

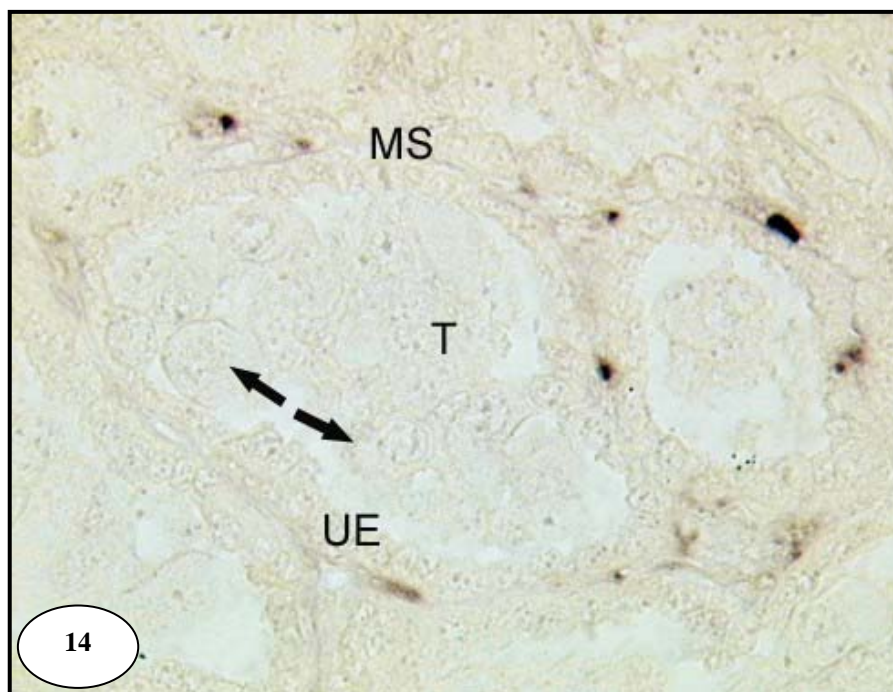
Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch unter Verwendung eines 2%-igen Agarosegels. In dieser physikalischen Matrix werden die PCR-Produkte nach ihrer Größe getrennt. Das nach der Primerauswahl zu erwartende spezifische PCR-Produkt mit einer Größe von 333 bp, erscheint nach der RT-PCR in allen drei getesteten Trächtigkeitsstadien (Tag 120, 180 und 270) gleichmäßig. Die Banden des Markers entsprechen je 100 Basenpaaren.



**Abbildung 13:** Amplifikate der OPN mRNA werden in allen drei unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien spezifisch mit einer Basenpaarlänge (**bp**) von 333 bp exprimiert. Marker (**M**), Tag (**d**).

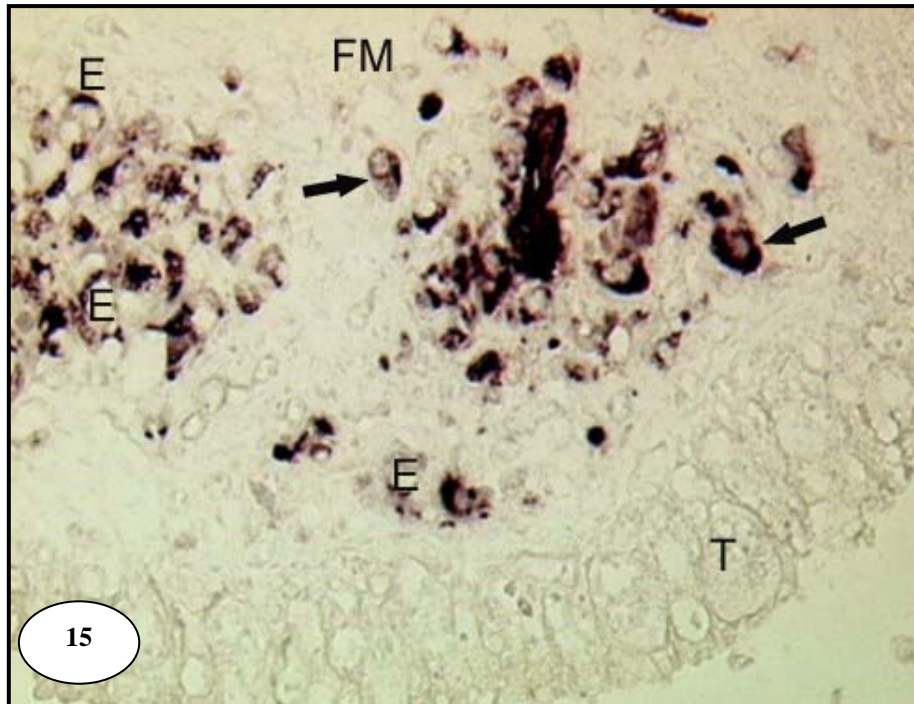
### 3.3.3 Lokalisierung der OPN mRNA in der Rinderplazenta durch in situ Hybridisierung

Die Hybridisierung mit der Antisense Sonde wurde durch eine braun-schwarze Färbung im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen. Plazentomär exprimierten Endothelzellen der Gefäße des maternalen Stromas und des fetalen Mesenchyms OPN mRNA. Interplazentomär erfolgte der Nachweis von OPN Transkripten im fetalen Mesenchym und auch dort vor allem in den Endothelzellen. Auch bei der in situ Hybridisierung wurden keine Veränderungen im Verlauf der Gravidität beobachtet.



**Abbildung 14:** In situ Hybridisierung für OPN im Zentrum des Plazentoms, circa 180. Tag der Gravidität. Es ist ein starkes Signal in den Endothelzellen der Gefäße des maternalen Stromas (**MS**) zu beobachten. Trophoblast (**T**), Trophoblastriesenzellen (**Pfeile**), Uterusepithel (**UE**). Vergrößerung: 400-fach.





**Abbildung 15:** Nachweis von OPN durch in situ Hybridisierung im interplazentomären Gewebe, circa 80. Tag der Gravidität. Nachweis von OPN-Transkripten im fetalen Mesenchym (**FM**), besonders in den Endothelzellen (**E**). Weiterhin erscheinen Zellen, die möglicherweise dem Immunsystem zuzurechnen sind, positiv (**Pfeile**). Trophoblast (**T**). Vergrößerung: 400-fach.

## **IV. DISKUSSION**

### **4.1 Kritische Betrachtung der Methoden**

Sowohl bei der Immunhistologie als auch bei der Immunfluoreszenz wurden Gefrierschnitte aufgrund der besseren Antikörpergängigkeit im Gewebe Paraffinschnitten vorgezogen.

Die Gefrierschnitte wurden mit einer relativ großen Schnittdicke von 13 µm angefertigt, um die Morphologie des Gewebes besser zu erhalten. Die Zusammenhangstrennung zwischen Trophoblast und maternalem Epithel konnte trotzdem nicht vermieden werden, so dass in diesem Bereich häufig eine Lücke entstand. Um bei beiden Methoden bezüglich Morphologie und Immunreaktion zu einem befriedigenden Ergebnis zu kommen, wurde die Fixierung in der Immunhistochemie mit Azeton/Methanol im Verhältnis 70:30 für 10 Sekunden bei Raumtemperatur (Hirsch 2000) und in der Immunfluoreszenz für 10 Minuten in 100%-igem Methanol bei –20°C (Johnson et al. 1999b) vorgenommen.

Die partiell leichte Unschärfe der Fotografien im Ergebnisteil ergibt sich aus der oben erwähnten Schnittdicke, da sich in Verbindung mit der Färbereaktion häufig keine einheitliche, scharf zu fokussierende Ebene mehr finden ließ. Bei der Immunhistochemie kam es im Lumen der Blutgefäße, sowie im Bereich der artifiziellen Zusammenhangstrennungen zur unspezifischen Anfärbung der Schnitte. Außerdem zeigten einzelne Schnitte eine leichte Hintergrundfärbung, die mit Hilfe der Negativkontrolle ebenfalls als unspezifisch bestätigt werden konnten. Für die unterschiedliche Intensität der Nachweisreaktionen von OPN Antikörper LF-123 und LF-124 in der Immunhistochemie und in der Immunfluoreszenz kommen verschiedene Erklärungen in Betracht. Einerseits könnten die unterschiedlichen Fixierungen und andererseits die Temperaturen bei der Vorbehandlung der Gefrierschnitte eine Rolle spielen. Die in der Immunhistochemie schwache Nachweisreaktion von OPN Protein in den Trophoblastzellen konnte mittels der Immunfluoreszenz deutlich intensiviert werden, was sich durch die andere Vorbereitung (Fixierung mit –20°C kaltem Methanol siehe Kapitel 3.2.1.1. und 3.2.2.2.) der Gefrierschnitte erklären lässt, aber auch durch die Tatsache, dass sich sehr geringe Mengen von Antigenen mittels Fluorochromen besser darstellen lassen.

## DISKUSSION

Im Gegensatz zur Immunhistochemie konnten für die in situ Hybridisierung sehr viel dünnere Paraffinschnitte verwendet werden, welche sich im Allgemeinen durch eine ausgezeichnete Morphologie auszeichnen.

### **4.3 Vergleichende Betrachtung des Vorkommens von OPN bei den Tierarten Rind, Schaf und Schwein und beim Menschen**

Die endometriale Ausschüttung von Integrinen und ihren ECM Liganden korreliert in vielen Spezies mit der Embryoeinnistung und der Ausdifferenzierung des Uterus während der Gravidität (Bowen et al. 1996, Fazleabas et al. 1997, Kimmins et al. 1999, Apparao et al. 2001, Johnson et al. 2001, MacIntyre et al. 2002). Das bekannteste Integrin, welches Liganden wie Fibronectin, OPN und Laminin mittels ihrer Arg-Gly-Asp (RGD) Sequenz bindet, ist das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (Sasaki et al. 2001, Johnson et al. 2003). Die Affinität von Integrinen zu ihren Liganden ist vom Zelltyp abhängig und wird durch Phosphorylierung im Zytoplasma (inside out signaling) und von den Liganden (outside in signaling) aktiviert (Jamora et al. 2002, Miranti et al. 2002). Bei Maus, Mensch, Pavian und Schaf zeigte sich, dass das Zusammenwirken von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  und OPN im Uterusepithel für die Anheftung und Invasion des Trophoblasten erforderlich ist (Coutifaris et al. 1998; Johnson et al. 1999, 2001; Apparao et al. 2001; MacIntyre et al. 2002). Die Blockierung des  $\alpha_v\beta_3$  Integrins im Mäuseuterus konnte die Implantation von Embryonen verhindern (Coutifaris et al. 1998). Beim zyklischen und tragenden Schaf werden die verschiedenen Integrinuntereinheiten apikal von Uterusepithelien und vom Trophoblasten exprimiert (Johnson et al. 2001, 2003) wohingegen in der Rinderplazenta, die eine ähnliche Anatomie aufweist wie die Schafplazenta, keine epitheliale Expression von  $\alpha_v\beta_3$ , sondern eine Lokalisation im maternalen Karunkelstroma (Hirsch 2003) sowie interkarunkulär (Kimmins et al. 1999, 2003) festgestellt wurde, was dafür spricht, dass Wechselwirkungen von OPN mit Integrin  $\alpha_v\beta_3$  nur im Stroma, nicht aber an der feto-maternalen Kontaktlinie stattfinden. Beim Rind zeigten sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede in dem Vorkommen von OPN mRNA und OPN Protein in den unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien, die anhand der fetalen SSL errechnet wurden. Die Lokalisation des OPN Proteins entsprach weitgehend der der mRNA. Abweichend hiervon konnte in den Trophoblastzellen und uterinen Drüsenepithelien keine OPN mRNA nachgewiesen werden. Es zeigten sich in der Rinderplazenta keine Unterschiede in der Lokalisation von Antikörper LF-123 und LF-124, wohingegen beim Schaf einige Unterschiede beobachtet wurden. Der LF-123 Antikörper ist beim Schaf in den uterinen Drüsenepithelien zwischen Tag 20 und 120 der Trächtigkeit zu finden, während LF-124 eine positive Immunantwort im luminalen Epithel, im Trophektoderm und entlang der

feto-maternalen Kontaktlinie sowohl plazentomär als auch interplazentomär bewirkt (Johnson et al. 2003). Beide Immunglobuline ermitteln das native 70-kDa OPN, aber nur das LF-124 kann auch das 45-kDa OPN binden, welches die Sequenz der RGD-Integrinbindung enthält (Senger et al. 1996). Dieses 45-kDa Fragment ist die hauptsächliche Form von OPN in den Uterusdrüsen von tragenden Schafen (Johnson 1999a und Johnson 1999b). Es ist apikal in den Epithelien des Uteruslumens am 14. Tag p. i., am 20. Tag im Trophektoderm und entlang der feto-maternalen Kontaktlinie bis Tag 120 p. i. zu finden (Johnson et al. 2003). Im Gegensatz zu Schaf und Schwein, bei denen das 45-kDa Fragment hauptsächlich vorkommt, ist bei der Ziege fast ausschließlich die native 70-kDa Form des OPN zu finden. Sie ist im Endometrium an allen Tagen des Zyklus sowie während der Trächtigkeit und in der ausgespülten uterinen Flüssigkeit vorhanden, was darauf schließen lässt, dass ein stabiles Protein während des Zyklus gebildet wird, welches dann erhalten bleibt (Joyce et al. 2005).

#### 1. OPN Expression/Lokalisation im luminalen Epithel

In der aktuellen Studie wurde OPN Protein in Trophoblastzellen wie auch uterinen Epithelzellen der Rinderplazentome lokalisiert.

Schon während der Implantation des Embryos nehmen Integrine über das Zusammenspiel mit ECM Proteinen eine wichtige Rolle ein. Durch Bindung mit ECM Liganden, wie OPN, kommt es zur Reorganisation des gesamten Zytoskeletts, zu einer Stabilisierung der feto-maternalen Adhäsion und zur Zellwanderung (Giancotti und Ruoslahti 1999). Johnson et al. (2001) konnten während der Periimplantationsphase bei Schafen, die Integrinuntereinheiten  $\alpha_v$ , 4 und 5 sowie  $\beta_1$ , 3 und 5 konstitutiv auf der apikalen Oberfläche von Trophoblast und Endometrium nachweisen. Veränderungen in der Integrinexpression korrelieren häufig mit verschiedenen Ursachen der Infertilität (Lessey 1998) und funktionale Blockaden von bestimmten Integrinen, reduzieren die Implantationsrate (Illera et al. 2000). Bei den Tierarten Schwein und Maus, sowie beim Menschen ist das Zusammenspiel von bestimmten Integrinen und ihren ECM Proteinen eine Grundlage des mutmaßlichen „Window of Implantation“ (Carson et al. 2000, Burghardt et al. 2002, Lessey 2002). In der menschlichen Plazenta bindet OPN hauptsächlich an die Integrinuntereinheit  $\alpha_v$  (Hu et al. 1995), wodurch Prozesse wie zum Beispiel Zellbindung und Zellaktivierung vermittelt werden. Es hat sich gezeigt, dass  $\alpha_v\beta_3$  Integrine vom Synzytiotrophoblasten synthetisiert werden, nicht aber von mononukleären Zytotrophoblastzellen (Vanderpuye et al. 1991). Omigbodun

et al. (1995b) vermuten, dass humane Zytotrophoblastzellen mittels OPN an  $\alpha_v\beta_3$  Integrine des Synzytiotrophoblasten binden und so die Integrität der Chorionzotten sicherstellen.

Bestimmte Integrinrezeptoren für OPN, wie  $\alpha_v\beta_3$  sind insbesondere auf den Trophoblastzellen und im luminalen Epithel des Uterus von Menschen und anderen Spezies zu finden. Einige dieser Integrine werden während der Periimplantationsphase induziert (Lessey et al. 1994, Bowen et al. 1997, Johnson et al. 2001). Beispielsweise wird OPN mRNA ab Tag 12 insbesondere in Uterusepithelzellen des Schweins, die in Kontakt mit dem Trophoblasten stehen, exprimiert (Garlow et al. 2002). Im Gegensatz dazu scheint OPN mit dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  in der Rinderplazenta während der Implantationsphase keine Wechselwirkungen einzugehen (Kimmins et al. 2004).

In der vorliegenden Studie konnte in der ISH im Vergleich zur Immunfluoreszenz keine positive Immunreaktion in den Trophoblastzellen nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass in der Immunfluoreszenz Reste von in frühen Stadien produziertem OPN Protein detektiert wurden, zum Zeitpunkt der Untersuchung jedoch keine OPN mRNA mehr nachweisbar war. Diese Diskrepanz lässt sich weiterhin durch die Tatsache erklären, dass OPN möglicherweise während der Implantation in großen Mengen in den uterinen Drüsen produziert und sezerniert wird und auf diese Weise zwischen fetale und maternale Komponenten der Plazentome gelangt und hier als Brückenmolekül zwischen den Integrinrezeptoren des Trophoblasten und des uterinen Epithels fungieren könnte, wie es für das Schaf beschrieben wurde (Johnson et al. 1999a, 2003a,b).

In vitro Versuche mit Trophoblasten und luminalen Epithelzellen von Schaf und Schwein haben gezeigt, dass die Integrinrezeptoraktivität und die damit verbundene Umgestaltung des Zytoskeletts eine Antwort auf die OPN Bindung ist (Johnson et al. 2001, Garlow et al. 2002). Damit könnte in vivo sezernierte OPN Integrinrezeptoren auf Trophoblastzellen und luminalen Epithelien des Endometriums binden und auf diese Weise Veränderungen bezüglich der Proliferation, Migration, Überlebenschancen, Adhäsion und Umstrukturierung des Konzeptus hervorrufen. Diese Prozesse sind entscheidend für die Entwicklung des Konzeptus, der sich ausdehnt, dem uterinen Lumen anpasst und schließlich mit dem luminalen Epithel „verklebt“ (Johnson et al. 1999a, 2003a, b). Johnson et al. (1999a) stellen die Hypothese auf, dass OPN mittels Integrin  $\alpha_v\beta_3$  als eine Art bifunktionaler Brückenligand fungiert, welcher die Adhäsion zwischen luminalen Epithel und Trophoblast induziert und somit essentiell für die

Implantation und Plazentation ist. Diese Hypothese wird durch Versuche untermauert, in denen eine Blockierung des  $\alpha_v\beta_3$  Integrins bei Mäusen die Implantation von Embryonen verhindern konnte (Coutifaris et al. 1998).

## 2. OPN Expression/Lokalisation im Drüsenepithel

In der vorliegenden Studie zeigte sich in der Immunfluoreszenz ein starkes positives Signal für OPN Protein apikal in den Zellen der uterinen Drüsen um den 140. Tag der Trächtigkeit. Jedoch konnte zu dem Zeitpunkt keine OPN mRNA in den uterinen Drüsen des Rindes nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz könnte mit der Tatsache begründet werden, dass OPN beim Rind nur in frühen Stadien der Trächtigkeit produziert wird (Kimmins et al. 2004) und zu späteren Zeitpunkten nur das Protein, nicht aber die mRNA vorhanden ist. Beim Schaf wird OPN während der Trächtigkeit von den Drüsenepithelien des Endometrium in den Uterus sezerniert (Johnson et al. 2003b). Die Expression beginnt während der Periimplantationsphase in der OPN mRNA ab Tag 13 p.i. in einigen endometrialen Drüsen exprimiert wird und zwischen Tag 15 und 19 deutlich ansteigt, wohingegen im Konzeptus am Tag 19 p.i. keine OPN mRNA nachweisbar ist (Johnson et al. 1999b). Parallel zu dem Anstieg der OPN mRNA wurde eine Hypertrophie der uterinen Drüsen zwischen Tag 50 und 60 beobachtet (Johnson et al. 2003). Im Gegensatz dazu steht das Schwein, welches im Vergleich zum Schaf und Rind eine sogenannte „wahre“ epitheliochoriale Plazentation besitzt, in der das luminale Epithel des Uterus während der ganzen Trächtigkeit völlig intakt bleibt (Corner 1921). Beim Schwein wird OPN während der gesamten Trächtigkeit in den luminalen Epithelzellen des Uterus synthetisiert, in den Drüsenepithelien dagegen wird OPN mRNA erst ab Tag 35 beobachtet, mit einem Anstieg bis Tag 85 der Trächtigkeit (Garlow et al. 2002). Dieses ist auch bei anderen Tierarten der Fall, die Osteopontin in den späteren Trächtigkeitsstadien in den Epithelzellen der uterinen Drüsen exprimieren, vermutlich um eine ununterbrochene Ausschüttung zu gewährleisten (Ka et al. 2000). Brown et al. (1992) wiesen OPN sowohl in den Drüsen des Endometriums, als auch im luminalen Epithel der Eileiter von schwangeren Frauen nach. Im Verlauf des menschlichen Menstruationszykluses nimmt OPN deutlich ab. Zu dieser Zeit sind die uterinen Drüsenepithelien die Quelle des OPN Proteins. Wie bereits erwähnt, wird OPN die Rolle eines molekularen Markers und Mediators im „Fenster der Implantation“ der Frau zugesprochen (Coutifaris et al. 1997). Eine OPN Expression in uterinen Drüsen wurde bislang als typisch für Spezies

angesehen, die eine invasive Plazentation haben, wie zum Beispiel Primaten und Mäuse (Omigbodun et al. 1997, Brown 1992).

Die für das Schaf aufgeführten neueren Ergebnisse lassen aber schlussfolgern, dass das OPN Protein auch bei dieser Tierart von den Epithelien der Uterusdrüsen synthetisiert und sezerniert wird, und damit während der Trächtigkeit eine besondere Bindungsaffinität zu der feto-maternalen Kontaktzone besitzt (Johnson et al. 2003). Die spezifische Induktion zum Zeitpunkt der Implantation und Lokalisation an der feto-maternalen Grenze lässt vermuten, dass OPN Einfluss auf die feto-maternale Entwicklung und Wachstum nimmt und für die Einnistung der Blastozyste von großer Bedeutung ist (Johnson et al. 2003). Diese Hypothese wird auch durch die aufgeführten in vitro Studien unterstützt. Die OPN Ausschüttung aus den Uterusdrüsen ist bei allen untersuchten Tierarten progesteronabhängig und korreliert mit der Abnahme von Progesteron in den uterinen Drüsen (Spencer et al. 1999b, Johnson et al. 2000).

### 3. Stromale Expression/Lokalisation von OPN

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass OPN in allen untersuchten Stadien insbesondere in den stromalen Anteilen sowohl der fetalen als auch auf der maternalen Seite der Rinderplazenta zu finden ist. OPN mRNA Transkripte und OPN Protein wurden in den Endothelzellen des maternalen Stromas nachgewiesen. Eine solche Lokalisation erscheint wahrscheinlich und sinnvoll, da parallel die Integrinuntereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  und  $\alpha_v$  sowie  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_4$  im maternalen Stroma der Rinderplazentome zu finden sind, welche in Form von Heterodimeren OPN binden können (Hirsch 2000). Die Integrinheterodimere  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$  können OPN binden, wobei  $\alpha_v\beta_3$  die stärkste Bindungsaffinität zeigt (Marcinkiewicz et al. 2000, Johnson et al. 2003). Eine stromale Expression von OPN wurde in Dezidualzellen von Primaten, wie dem Pavian und Mensch beschrieben (Nomura et al. 1988, Young et al. 1990, Coutifaris et al. 1997, Fazleabas et al. 1997, von Wolff et al. 2004) und mit immunmodulatorischen Funktionen erklärt, die gerade in invasiven hämochorialen Plazenten von Bedeutung sind. Allerdings scheint sich die Funktion von OPN nicht auf die Trächtigkeit zu beschränken, denn es zeigte sich in endometrialen Stromazellen eine Aufregulation von OPN gegen Ende des menschlichen Zyklus (Apparo et al. 2001). Die Dezidualisierung wird im Allgemeinen als Charakteristikum der invasiven Implantation von Primaten und Nagern gesehen. Erstaunlicherweise kommt OPN mRNA und Protein auch im endometrialen Stroma von trächtigen Schafen



vor, wo gleichzeitig Stromazellen größer werden, ihre Form verändern und die klassischen Dezidualisierungsmarker Desmin und  $\alpha$  smooth muscle Actin exprimieren (Johnson et al. 2003). Bei der Ziege kommt es zu einer Hochregulation von OPN und  $\alpha$  smooth muscle Actin, nicht aber Desmin in den späten Implantationsstadien (Joyce et al. 2005). Diese, der Dezidualisierung ähnlichen Vorgänge, werden mit der Invasion von TGC in das uterine Epithel in Verbindung gebracht (Joyce et al. 2005), die mit einer eingeschränkten Trophoblastinvasion gleichzusetzen sind. Im Gegensatz zu Schaf und Ziege ist OPN mRNA während der nicht invasiven Implantation des Schweins nur am Tag 9 der Trächtigkeit, aber auch des Zyklus, in einigen Zellen des Stratum compactum nachweisbar, die den Immunzellen zugerechnet werden (Garlow et al. 2002).

Beim Schaf wurde während des Zyklus und der frühen Trächtigkeit OPN mRNA in verstreuten Zellen des Endometriums mittels in situ Hybridisierung detektiert, wobei sich die Zellen an den Tagen 1, 5 und 7 des Zyklus fokal unterhalb des luminalen Epithels im Stratum compactum konzentrierten (Johnson et al. 1999a). Man nimmt an, dass es sich bei den OPN positiven Zellen im uterinen Stroma um Immunzellen handelt, da OPN auch als early T-cell activation (Eta)-1 Zytokin bekannt ist (Johnson et al. 1999a). OPN/Eta-1 wurde aus T-Helferzellen kloniert und sequenziert (Patarca et al. 1989) und ist das häufigste Protein, welches von verschiedenen Lymphozytenpopulationen sezerniert wird (Fresno et al. 1981, 1982; Cone et al. 1983). OPN/Eta-1 wird nach Gewebeverletzungen von Monozyten und Makrophagen exprimiert (Murray et al. 1994) wie auch in aktivierten  $CD8^+$   $CD4^+$  positiven natürlichen Killerzellen, einschließlich granulierten metrial gland cells (Fresno et al. 1982).

Die immunologische Rolle OPN/Eta-1 ist hoch interessant, da es an den CD44 Rezeptor von Lymphozyten und Monozyten bindet und somit eine Chemotaxis dieser Zellen aus dem Blutstrom in die Bezirke der Entzündung hervorruft (Weber et al. 1996). Eine Spaltung von OPN/Eta-1 lässt Proteine der Größe von 24 und 45 kDa entstehen, welche Antigene binden und T-Helferzellen supprimieren (Fresno et al. 1981). Das 45 kDa Fragment vermag weiterhin die Immunglobulinproduktion von B-Lymphozyten zu steigern (Fresno et al. 1982).

Die Anwesenheit von OPN in den fetalen Gefäßendothelien der Plazentome korreliert mit den Ergebnissen zur Lokalisation von Integrinen in der bovinen Plazenta, wonach sich die OPN bindenden Integrin Untereinheiten  $\alpha_4$  und  $\beta_1$  in fetalen Gefäßendothelien

befanden und mit einer Beeinflussung des Zottenwachstums in Verbindung gebracht wurden (Hirsch 2000).

In der vorgelegten Studie befanden sich OPN Transkripte in der in situ Hybridisierung auch in Zellen des fetalen Mesenchyms, die vermutlich dem Immunsystem zuzuordnen sind und wie schon erwähnt, kamen sowohl OPN mRNA als auch das zugehörige Protein gefäßassoziiert vor. In der menschlichen Plazenta wird OPN eine Rolle bei zellulären Prozessen, wie der Neovaskularisation und bei Gewebsveränderungen zugesprochen, da OPN dort zytokinähnlich agiert, indem es auf Makrophagen chemotaktisch wirkt und die IgM- und IgG Antikörperproduktion durch B-Zellen stimuliert (Lampe et al. 1991). Neben der Aktivierung von T-Zellen (Singh et al. 1990) zeigte sich, dass OPN eine wichtige Funktion in der Stickstoffmonoxid Synthese (Hwang et al. 1994) einnimmt, welche eine Gefäßdilatation vermittelt. Diese Synthese ist sehr wichtig für eine normale Plazentation und Plazentafunktion, da über den Gefäßdurchmesser der Blutdruck und die Blutflussgeschwindigkeit reguliert wird (Hagen/Poiseuille Gesetz) und so die feto-maternale Austauschkapazität beeinflusst wird. Treten Veränderungen in diesen OPN zugesprochenen Funktionen ein, kommt es während der Schwangerschaft zu Komplikationen, wie zum Beispiel der Präeklampsie (Omigbodun et al. 1997).

Es lässt sich somit schlussfolgern, dass OPN in den Plazentomen des Rindes nicht die gleiche Rolle spielt wie beim eng verwandten Schaf, da an der feto-maternalen Kontaktlinie der potentielle Ligand, das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , nicht mit OPN koexprimiert wird. Dies deutet darauf hin, dass beim Rind, im Gegensatz zu Nagern und Primaten, diese Proteine nicht miteinander agieren, um eine Embryoanheftung zu ermöglichen (Kimmins et al. 2004) und bestätigt die Hypothese, dass die Interaktion von Integrinen mit der ECM speziesspezifisch ist (Bowen et al. 1996).

Unsere Studie am Rind zeigte aber, dass OPN im Bindegewebe plazentomärer und interplazentomärer Regionen des Rindes vorkommt, wo auch die Untereinheiten potentieller Integrinliganden präsent sind. In dieser Lokalisation ist eine Einflussnahme von OPN auf das Wachstum und die Differenzierung der Plazentome sowie ihre Funktion sehr wahrscheinlich.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Expression von Osteopontin (OPN) wurde an Rinderplazenten vom 30. bis 270. Tag der Trächtigkeit mittels immunhistochemischem Nachweisverfahren und Immunfluoreszenz unter Verwendung von fluoreszeinmarkierten Esel Anti-Kaninchen Antikörpern ermittelt und lichtmikroskopisch beziehungsweise mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierfür wurden Gefrierschnitte verwendet. Des Weiteren wurde OPN mRNA mittels der RT-PCR und der In situ Hybridisierung nachgewiesen. Die Extraktion von OPN mRNA und OPN Protein erfolgte aus schockgefrorenen Rinderplazentomen.

Immunhistochemisch war plazentomär eine starke, meist gefäßassoziierte Immunreaktion im maternalen Stroma zu finden. Im fetalen Mesenchym zeigten besonders Endothelien eine starke Immunfärbung für Osteopontin, während die umgebenden Fibroblasten nur eine schwache Färbung aufwiesen. Interplazentomär war apikal im Chorionepithel, sowie im Uterus- oder Karunkelepithel eine starke Immunantwort zu sehen. In der Immunfluoreszenz zeigte sich plazentomär eine starke Immunreaktion in den Trophoblastzellen und ein schwächeres Signal im maternalen Stroma. Interplazentomär konnte eine starke Immunfärbung apikal in den Zellen der uterinen Drüsen nachgewiesen werden. In der Immunhistochemie und -fluoreszenz erzeugten die Osteopontin Antikörper LF-123 und LF-124 ein starkes gefäßassoziiertes Signal. Die zugehörige Osteopontin mRNA wurde mittels eines spezifischen 333 bp RT-PCR Produktes in drei verschiedenen Trächtigkeitsstadien (Tag 120, 180 und 270) nachgewiesen. Über in situ Hybridisierung wurde OPN mRNA plazentomär in Gefäßendothelzellen des maternalen Stromas und im fetalen Mesenchym lokalisiert. Interplazentomär erfolgte der Nachweis von OPN Transkripten im fetalen Mesenchym und auch dort vor allem in den Endothelzellen sowie in einer Population von noch näher zu charakterisierenden Zellen, die möglicherweise dem Immunsystem zuzurechnen sind. Die OPN mRNA und -proteinexpression zeigte beim Rind keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Trächtigkeit.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie lässt sich schließen, dass OPN an zwei Orten produziert und sezerniert wird; erstens in den uterinen Drüsen und zweitens in den Zellen des maternalen Septenstromas sowie in den Zellen des fetalen Zottenmesenchyms. Diese Tatsache spricht für mindestens zwei differenzierte Funktionen von OPN. 1. OPN könnte auch beim Rind die feto-maternalen Anheftung

während der Implantation vermitteln, die nicht Gegenstand dieser Studie war. Hier verteilt sich in den Drüsen produziertes OPN an der feto-maternalen Grenzfläche und fungiert als Brückenmolekül zwischen Oberflächenrezeptoren (z.B. Integrinen) des Trophoblasten und des uterinen Epithels. 2. OPN spielt vermutlich als ein Ligand für die Integrinrezeptoren im maternalen Stroma und im fetalen Mesenchym eine Rolle und nimmt so möglicherweise Einfluss auf das Wachstum und die Ausdifferenzierung von maternalen Septen und fetalen Zotten.

## VI. SUMMARY

The expression of osteopontin was determined in bovine placentomes between day 30 and day 270 of gestation by using immunohistochemical methods (Avidin-Biotin-Complex) and immunofluorescence staining (fluorescein-conjugated goat antibody against rabbit IgG) and was examined via light microscopy or with fluorescence microscopy. To do so, frozen sections were utilized. Furthermore, the presence of OPN mRNA was detected by means of RT-PCR and localized in tissue sections by in situ hybridisation. The extraction of OPN mRNA and protein was done from shock frozen bovine placentomes.

In placentomes, immunohistochemistry showed a strong mostly vasculature-associated immunoreaction in the maternal stroma. In the fetal mesenchyme especially endothelial cells showed a strong immunostaining for OPN, while the surrounding fibroblasts showed only a weak reaction. In interplacentomal areas, a strong immune answer was observed apically in the chorionic epithelium as well as in the uterine or caruncle epithelium. Using immunofluorescence, a strong immunological reaction appeared in placentomal trophoblast cells, while a weaker signal was observed in the maternal stroma. In interplacentomal areas, a strong immunostaining occurred apically in uterine glandular epithelium. With both methods the OPN antibodies LF-123 and LF-124 generated a strong vasculature related signal. The corresponding OPN mRNA was detected as a specific 333 bp RT-PCR product in three different stages of pregnancy (days 120, 180 and 270). In situ hybridisation localized OPN mRNA in the blood vessel walls of the maternal stroma and in the endothelial cells of the fetal mesenchyme in placentomes. In interplacentomal areas, OPN transcripts occurred in the fetal mesenchyme especially in endothelial cells as well as in a population of yet unidentified cells, which may be immune cells. In the course of the pregnancy no significant differences were observed concerning the OPN mRNA- and protein expression between the different stages.

From the results of the present study it can be concluded that OPN is produced in two distinct localizations of the bovine placenta, firstly in the uterine glands and secondly in the maternal stroma as well as in cells of the fetal mesenchyme. This fact speaks for at least two different functions of OPN. 1. OPN could mediate the bovine feto-maternal attachment during the implantation, which was not an object of this study. OPN produced in the glands could be spread on the fetal-maternal interface and act as a

## SUMMARY

bridge molecule between surface receptors (e.g., integrins) of the trophoblast cells and the uterine epithelium. 2. OPN could play an important role as a ligand for the integrin receptors in the maternal stroma and the fetal mesenchyme, thus possibly influencing growth and differentiation of maternal septa and fetal villi.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (1999) Lehrbuch der Zellbiologie. Wiley-VCH Verlag GmbH. 225-473

APPARAO KB, MURRAY MJ, FRITZ MA, MEYER WR, CHAMBERS AF, TRUONG PR, LESSEY BA (2001) Osteopontin and its receptor  $\alpha_v\beta_3$  integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. J Clin Endocrinol Metab 86, 4991-5000

BAULIEU EE (1989) Contragestation and other clinical applications of RU-486, an antiprogestosterone at the receptor. Science 245, 1351-1357

BAYLESS KJ, MEININGER GA, SCHOLTZ JM, DAVIS GE (1998) Osteopontin is a ligand for the  $\alpha_4\beta_1$  integrin. J Cell Science 111, 1165-1174

BECK K, HUNTER I, ENGEL J (1990) Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. FASEB J 4, 148-160

BENIRSCHKE K, KAUFMANN P (1995): Early development of the human placenta. In: Pathology of the human placenta, 3<sup>rd</sup> Edition, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, pages 49-55

BJÖRKMAN N, SOLLEN P (1960) Morphology of the bovine placenta at normal delivery. Acta Vet Scand 1, 347-362

BJÖRKMAN N (1968) Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. J Ultrastruct Res 24, 249-258

BJÖRKMAN NH (1969) Light and electron microscopic studies on cellular alterations in the normal bovine placentome. Anat Rec 163, 17-29

BLANKENSHIP TN, ENDERS AC, KING BF (1992) Distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the cell columns and trophoblastic shell of early macaque placentas. *Cell Tissue Res* 270, 241-248

BLANKENSHIP TN, ENDERS AC, KING BF (1993) Trophoblastic invasion and the development of uteroplacental arteries in the macaque: immunohistochemical localisation of cytokeratins, desmin, type IV collagen, laminin and fibronectin. *Cell Tissue Res* 272, 227-236

BOOS A (2000) Immunohistochemical assessment of collagen types I, II, IV and VI in biopsy samples of the uterine wall collected during the oestrous cycle. *Cells Tissue Organs* 167, 225-238

BOSHIER DP (1969) A histological and histochemical examination of implantation and early placentome formation in sheep. *J Reprod Fertil* 19, 51-61

BOWEN JA, BAZER FW, BURGHARDT RC (1996) Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo. *Biol Reprod* 55, 1098-1106

BOWEN JA, BAZER FW, BURGHARDT RC (1997) Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vitro. *Biol Reprod* 56, 409-415

BROWN LF, BERSE B, VAN DE WATER L, PAPADOPOULOS-SERGIOU A, PERRUZZI CA, MANSEAU EJ, DVORAK HF, SENGHER DR (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissue: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 3, 1169-1180

BURGHARDT RC, BOWEN JA, NEWTON GR, BAZER FW (1997) Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs. *J Reprod Fertil (Suppl)* 52, 151-164



BURGHARDT RC, JOHNSON GA, JAEGER LA, KA H, GARLOW JE, SPENCER TE, BAZER FW (2002) Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells Tissues Organs* 172, 202-217

BUTLER WT (1989) The nature and significance of Osteopontin. *Connect Tissue Res* 23, 123-136

CARSON DD, BAGCHI I, DEY SK, ENDERS AC, FAZLEABAS AT, LESSEY BA, YOSHINAGA K (2000) Embryo implantation. *Dev Biol* 223, 217-237

CASTELLUCCI M, CRESCIMANNO C, SCHRÖTER CA, KAUFMANN P, MÜHLHAUSER J (1993) Extravillous trophoblast: immunohistochemical localization of extracellular matrix molecules. In: Genazzani AR, Petraglia F, Genazzani AD (eds) *Frontiers in gynecologic and obstetric investigation. Parthenon*, New York, pp. 19-25

CONE RE, ROSENSTEIN RW, JANEWAY CA (1983) Affinity-purified antigen-specific products produced by T-cells share epitopes recognized by heterologous antisera against several different antigen-specific products from T-cells. *Cell Immunol* 82,232–245.

CORNER GW (1921) Cyclic changes in the ovaries and uterus of the sow, and their relation to the mechanism of implantation. In: *Contribution to Embryology* 64. Carnegie Institute, 117-150

COUTIFARIS C, ZIOLKIEWICZ P, OMIGBODUN A, HARPER J (1997) Osteopontin in human endometrium: a role for this secretory protein in uterine receptivity and embryo implantation. In: *Serono Symposia USA. International Symposium on Embryo Implantation. Molecular, Cellular and Clinical Aspects*, 14 (abstract)

COUTIFARIS C, OMIGBODUN A, COUKOS G (1998) Integrins, endometrial maturation, & human embryo implantation. *Semin Reprod Endocrinol* 16, 219-229

DAITER E, OMIGBODUN A, WANG S, WALINSKY D, STRAUSS JF 3rd, HOYER JR, COUTIFARIS C (1996) Cell differentiation and endogenous cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate regulate osteopontin expression in human trophoblasts. *Endocrinology* 137, 1785-1790

DANTZER V, BJÖRKMAN N, HASSELAGER E (1981) An electron microscopic study of histotrophe in the interareolar part of the porcine placenta. *Placenta* 2, 19-28

DAVIES J, WIMSATT WA (1966) Observation on the fine structure of the sheep placenta. *Acta Anat* 65, 182-223

DENDA S, REICHARDT LF, MUELLER U (1998) Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell* 9, 1425-1435

DENHARDT DT, GUO X (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7, 1475-1483

FAZLEABAS AT, BELL SC, FLEMING S, SUN J, LESSEY BA (1997) Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 56, 348-356

FEINBERG RF, KLIMAN HJ, LOCKWOOD CJ (1991) Is oncofetal fibronectin a trophoblast glue for human implantation. *Am J Pathol* 138, 537-543

FEINBERG RF, KLIMAN HJ, WANG CL (1994) Transforming growth factor-beta stimulates trophoblast oncofetal fibronectin synthesis in vitro: implications for trophoblast implantation in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 1241-1248

FRANK HG, MALEKZADEH F, KERTSCHANSKA S, CRESCIMANNO C, CASTELLUCCI M, LANG I, DESOYE G, KAUFMANN P (1994) Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. *Acta Anat* 150, 55-68

FRANK HG, HUPPERTZ B, KERTSCHANSKA S, BLANCHARD D, ROELCKE D, KAUFMANN P (1995) Anti-adhesive glycosylation of fibronectin-like molecules in human placental matrix-type fibrinoid. *Histochem Cell Biol* 104, 317-329

FRANZEN A, HEINEGARD D (1985) Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232, 715-724

FRESNO M, MCVAY-BOUDREAU L, NABEL G, CANTOR H (1981) Antigen-specific T-lymphocyte clones. II. Purification and biological characterization of an antigen-specific suppressive protein synthesized by cloned Tcells. *J Exp Med* 153, 1260–1274.

FRESNO M, MCVAY-BOUDREAU L, CANTOR H (1982) Antigen-specific T-lymphocyte clones. *J Exp Med* 155, 981–993.

FRESNO M, DERSIMONIAN H, NABEL G, CANTOR H (1982) Proteins synthesized by inducer T-cells: evidence for a mitogenic peptide shared by inducer molecules that stimulate different cell types. *Cell* 30, 707–713.

GABLER C, CHAPMAN DA, GERENA RL, SORENSEN ES, KILLIAN GJ (1999) Osteopontin is present in the bovine oviduct epithelium and luminal fluid. *Biol Reprod* 60 (Suppl 1), 186

GARLOW JE, KA H, JOHNSON GA, BURGHARDT RC, JAEGER LA, BAZER FW (2002) Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biol Reprod* 66, 718-725

GEISERT RD, PATT TN, BAZER FW, MAYES JS, WATSON GH (1994) Immunocytochemical localization and changes in endometrial progesterin receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy. *Reprod Fertil Dev* 6, 749-760

GIANCOTTI FG, RUOSLAHTI E (1999) Integrin signaling. *Science* 283, 1028-1032

GILLE J, SWERLICK RA (1996) Integrins: role in cell adhesion and communication. Ann N Y Acad Sci 797, 93-106

GINSBERG MH, LOFTUS JC, PLOW EF (1988) Cytoadhesins, integrins and platelets. Thromb Haemost 59, 1-6

GREENSTEIN JS, MURRAY RW, FOLEY RC (1958) Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. Anat Rec 132, 321-341

GROSSER O (1927) Frühentwicklung, Eihautbildung und Plazentation des Menschen und der Säugetiere. In: Jaschke RT (ed) Deutsche Frauenheilkunde, Geburtshilfe, Gynäkologie und Nachbarggebiete in Einzeldarstellungen, vol. V. Bergmann, München

GUILLOMOT M (1999) Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation. Placenta 20, 339-345

HABERMEHL KH (1975) Die Altersbestimmung beim Hauswiederkäuer. In: Die Altersbestimmung bei Haus- und Labortieren. 2. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, pp. 62-63

HEMLER ME (1988) Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. Immunol Today 9, 109-113

HIRSCH P (2000) Immunhistochemische Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Expression von Zytokeratinen, extrazellulären Matrixproteinen und Integrinen im Plazentom des Rindes. Diss med vet, Giessen

HOFFMAN LH, WOODING FH (1993) Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. J Exp Zool, 266, 559-577

HWANG SM, LOPEZ CA, HECK DE, GARDNER CR, LASKIN DL, LASKIN JD, DENHARDT DT (1994) Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells. J Biol Chem 269, 711-715

HYNES RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. Cell 48, 549-554

HYNES RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69, 11-25

HU DD, LIN EC, KOVACH NL, HOYER JR, SMITH JW (1995) A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins  $\alpha_v\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_5$ . J Biol Chem 270, 26232-26238

ILLERA MJ, CULLINAN E, GUI Y, YUAN L, BEYLER SA, LESSEY BA (2000) Blockade of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin adversely affects implantation in the mouse. Biol Reprod 62, 1285-1290

JAMORA C, FUCHS E (2002) Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. Nat Cell Biol 4, 101-108

JOHNSON GA, SPENCER TE, BURGHARDT RC, BAZER FW (1999a) Ovine Osteopontin: I. cloning and expression of messenger ribonucleic acid in the uterus during the periimplantation period. Biol Reprod 61, 884-891

JOHNSON GA, BURGHARDT RC, SPENCER TE, NEWTON GR, OTT TL, BAZER FW (1999b) Ovine Osteopontin: II. osteopontin and  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. Biol Reprod 61, 892-899

JOHNSON GA, BURGHARDT RC, NEWTON GR, BAZER FW, SPENCER TE (1999) Development and characterization of immortalized ovine endometrial cell lines. Biol Reprod 61, 1324-1330

JOHNSON GA, SPENCER TE, BURGHARDT RC, TAYLOR KM, GRAY CA, BAZER FW (2000) Progesterone modulation of osteopontin gene expression in the ovine uterus. *Biol Reprod* 62, 1315-1321

JOHNSON GA, BAZER FW, JAEGER LA, KA H, GARLOW JE, PFARRER C, SPENCER TE, BURGHARDT RC (2001) Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol Reprod* 65, 820-828

JOHNSON GA, BURGHARDT RC, BAZER FW, SPENCER TE (2003a) Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* 69, 1458-1471

JOHNSON GA, BURGHARDT RC, JOYCE MM, SPENCER TE, BAZER FW, PFARRER C, GRAY CA (2003) Osteopontin expression in uterine stroma indicates a decidualization-like differentiation during ovine pregnancy. *Biol Reprod* 68, 1951-1958

JOHNSON GA, BURGHARDT RC, JOYCE MM, SPENCER TE, BAZER FW, GRAY CA, PFARRER C (2003b) Osteopontin is synthesized by uterine glands and a 45-kDa cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy. *Biol Reprod* 69, 92-98

JOYCE MM; GONZALEZ JF; LEWIS S; WOLDESENBET S; BURGHARDT RC; NEWTON GR; JOHNSON GA (2005) Caprine uterine and placental osteopontin expression is distinct among epitheliochorial implanting species. *Placenta* 26, 160-170

KA H, SPENCER TE, JOHNSON GA, BAZER FW (2000) Keratinocyte growth factor: expression by endometrial epithelia of the porcine uterus. *Biol Reprod* 62, 1772-1778

KIMMINS S, MAC LAREN LA (1999) Cyclic modulation of integrin expression in bovine endometrium. *Biol Reprod* 61, 1267-1274

KIMMINS S, LIM HC, PARENT J, FORTIER MA, MAC LAREN LA (2003) The effects of estrogen and progesterone on prostaglandins and integrin  $\beta_3$  (beta3) subunit expression in primary cultures of bovine endometrial cells. *Domest Anim Endocrinol* 25, 141-154

KIMMINS S, RUSSELL GL, LIM HC, HALL BK, MAC LAREN LA (2003) The effects of estrogen, its antagonist ICI 182, 780, and interferon-tau on the expression of estrogen receptors and integrin  $\alpha_v\beta_3$  on cycle day 16 in bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 38

KIMMINS S, LIM HC, MACLAREN LA (2004) Immunohistochemical localization of integrin alpha v beta 3 and osteopontin suggests that they do not interact during embryo implantation in ruminants. *Reprod Biol and Endocrinology* 28, 2-19

KING BF, BLANKENSHIP TN (1994) Differentiation of the chorionic plate of the placenta: cellular and extracellular matrix changes during development in the macaque. *Anat Rec* 240, 267-276

KISALUS L, HERR JC, LITTLE CD (1987) Immunolocalization of extracellular matrix proteins and collagen synthesis in first-trimester human decidua. *Anat Rec* 218, 402-415

KLISCH K (1998) Die Entwicklung boviner Trophoblastriesenzellen: Histologische, cytophotometrische und interphase-cytokinetische Untersuchungen zum Mechanismus der Genom-Multiplikation. *Diss med vet, Giessen*

KLISCH K, PFARRER C, SCHULER G, HOFFMANN B, LEISER L (1999) Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. *Anat Embryol* 200, 229-237

LAMPE MA, PATARCA R, IREGUI MV, CANTOR H (1991) Polyclonal B cell activation by the Eta-1 cytokine and the development of systemic autoimmune disease. *J Immunol* 147, 2902-2906

LIAW L, SKINNER MP, RAINES EW, ROSS R, CHERESH DA, SCHWARTZ SM, GIACHELLI CM (1995) The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of  $\alpha_v\beta_3$  in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* 95, 713-724

LEIBSON HJ, MARRACK P, KAPPLER JW (1981) B cell helper factors. I. Requirement for both interleukin 2 and another 40,000 mol wt factor. J Exp Med 154, 1681-1693

LEITCH AR, SCHWARZACHER T, JACKSON D, LEITCH IJ (1994) In situ-Hybridisierung aus der Reihe: Labor im Fokus, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford, 49-73

LESSEY BA, DAMJANOVICH L, COUTIFARIS C, CASTELBAUM A, ALBELDA SM, BUCK CA (1992) Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. J Clin Invest 90, 188-195

LESSEY BA, CASTELBAUM AJ, BUCK CA, LEI Y, YOWELL CW, SUN J (1994) Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. Fertil Steril 62, 497-506

LESSEY BA, ILESANMI AO, LESSEY MA, RIBEN M, HARRIS JE, CHWALISZ K (1996) Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation, contraception, and infertility. Am J Reprod Immunol 35, 195-204

LEISER R, KAUFMANN P, (1994) Placental structure: in a comparative aspect. Exp Clin Endocrinol 102, 122-134

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL JE (2001) Molekulare Zellbiologie, 4. Auflage, Spektrum Verlag

LONGHURST CM, JENNINGS LK (1998) Integrin-mediated signal transduction. Cell Mod Life Sci 54, 514-526

MACINTYRE DM, LIM HC, RYAN K, KIMMINS S, SMALL JA, MACLAREN LA (2002) Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix. Biol Reprod 66, 1430-1436



MACLAREN LA, WILDEMAN AG (1995) Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localisation of the  $\alpha_5$  and  $\beta_1$  integrin subunits in bovine trophoblast. *Biol Reprod* 53, 153-165

MAIN AL, HARVEY TS, BARON M, BOYD J, CAMPBELL ID (1992) The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell* 71, 671-678

MARCINKIEWICZ C, TAOOKA Y, YOKOSAKI Y, CALVETE JJ, MARCINKIEWICZ MM, LOBB RR, NIEWIAROWSKI S, SHEPPARD D (2000) Inhibitory effects of MLDG-containing heterodimeric disintegrins reveal distinct structural requirements for interaction of the integrin  $\alpha_9\beta_1$  with VCAM-1, tenascin-C, and osteopontin. *J Biol Chem* 275, 31930-31937

MARTIN KH, SLACK JK, BOERNER SA, MARTIN CC, PARSONS JT (2002) Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science* 296, 1652-1653

MAZZALI M, HUGES J, DANTAS M, LIAW L, STEITZ S, ALPERS CE, PICHLER RH, LAN HY, GIACHELLI CM, SHANKLAND SJ, COUSER WG, JOHNSON RJ (2002) Effects of cyclosporine in osteopontin null mice. *Kidney Int* 62, 78-85

MCKEE MD, NANJI A, KHAN SR (1995) Ultrastructural immunodetection of osteopontin and osteocalcin as major matrix components of renal calculi. *J Bone Miner Res* 10, 1913-1929

MIRANTI CK, BRUGGE JS (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4, 83-90

MIYAUCHI A, ALVAREZ J, GREENFIELD EM, TETI A, GRANO M, COLUCCI S, ZAMBONIN-ZALLONE A, ROSS FP, TEITELBAUM SL, CHERESH D, HRUSKA KA (1991) Recognition of osteopontin and related peptides by an  $\alpha_v\beta_3$  integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* 266, 20369-20374

MURRAY CE, GIACHELLI CM, SCHWARTZ SM, VRACKO R (1994) Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 145, 1450-1462

NABEL G, GREENBERGER J; SAKAKEENY MA, CANTOR H (1981) Multiple biologic activities of a cloned inducer T-cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 1157-1161

NEWTON CR, GRAHAM A (1994) PCR aus der Reihe: Labor im Fokus, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford, 19-46

NOMURA S, WILLS AJ, EDWARDS DR, HEATH JK, HOGAN BL (1988) Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* 106, 441-450

OMIGBODUN A, TESSLER C, COUKOS G, HOYER J, COUTIFARIS C (1995a) Human trophoplast adhesion to osteopontin is regulated by cell differentiation and divalent cations. *J Soc Gynecol Invest (Suppl)* 2, 199

OMIGBODUN A, DAITER E, WALYNSKI D, FISHER L, JOUNG M, HOYER JR, COUTIFARIS C (1995b) Regulated expression of osteopontin in human trophoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 21, 346-349

OMIGBODUN A, ZIOLKIEWICZ P, TESSLER C, HOYER JR, COUTIFARIS C (1997) Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblast: a model of paracrine control in the placenta? *Endocrinology* 138, 4308-4315

PATARCA R, FREEMAN GJ, SINGH RP (1989) Structural and functional studies of the early T-lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med* 170, 145-161

PFARRER C, HIRSCH P, GUILLOMOT M, LEISER R (2003) Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes. *Placenta* 24, 588-597

PIJNENBORG R, D'HOOGHE T, VERCRUYSSSE L, BAMBRA C (1996) Evaluation of trophoblast in placental bed biopsies of the baboon, with immunohistochemical localisation of cytokeratin, fibronectin and laminin. *J Med Primatol* 25, 272-281

PLOW EF, HAAS TA, ZHANG L, LOFTUS J, SMITH JW (2000) Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275, 21785-21788

QUARANTA V, JONES JC (1991) The internal affairs of an integrin. *Trends Cell Biol* 1, 2-4

RUOSLAHTI E, PIERSCHBACHER MD (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491-497

SASAKI T, TIMPL R (2001) Domain IVa of laminin  $\alpha_5$  chain is cell-adhesive and binds  $\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  integrins through Arg-Gly-Asp. *FEBS Lett* 509, 181-185

SCHNORR B (2001) Plazentation bei Haussäugetieren und Mensch, In: 3. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, pp. 66-89

SCHULER G, WIRTH C, KLISCH K, PFARRER C, LEISER R, HOFFMANN B (1999) Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod.* 61, 797-801

SENGER DR, LEDBETTER SR, CLAFFEY KP, PAPADOPOULOS-SERGIU, PERUZZI CA, DETMAR M (1996) Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the  $\alpha_v\beta_3$  integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 149, 293-305

SENGER DR, PERRUZZI CA (1996) Cell migration promoted by a potent GRGDS-containing thrombin-cleavage fragment of osteopontin. *Biochim Biophys Acta* 1314, 13-24

SINGH RP, PATARCA R, SCHWARTZ J, SINGH P, CANTOR H (1990) Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effect upon macrophages in vivo. *J Exp Med* 171, 1931-1942

SPENCER TE, BAZER FW (1995) Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod* 53, 1527-1543

SPENCER TE, GRAY A, JOHNSON GA, TAYLOR KM, GERTLER A, GOOTWINE E, OTT TL, BAZER FW (1999b) Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus. *Biol Reprod* 61, 1409-1418

SPENCER TE, JOHNSON GA, BAZER FW, BURGHARDT RC (2004) Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128, 657-668

SOBIRAJ A (1992) Untersuchungen zur Morphologie sowie zur Histochemie und Biochemie des Uterus bei Rindern in der frühen postpartalen Periode. Diss med vet, Giessen

SODEK J, GANSS B, MCKEE MD (2000) Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 279-303

STRAHL H (1911) Zur Kenntnis der Wiederkäuerplacentome. *Anat Anz* 40, 257-264

TABIBZADEH S (1990) Immunoreactivity of human endometrium: correlation with endometrial dating. *Fertil Steril* 54, 624-631

VAN DER FLIER A, SONNENBERG A (2001) Function and interactions of Integrins. *Cell Tiss Res* 305, 285-298

VANDERPUYE OA, LABARRERE CA, MCINTYRE JA (1991) A vitronectin-receptor-related molecule in human placental brush border membranes. *Biochem J* 280, 9-17

VON WOLFF M; BOHLMANN MK; FIEDLER C; URSEL S; STROWITZKI T (2004) Osteopontin is up-regulated in human decidual stromal cells. *Fertil Steril* 81, Suppl 1, 741-748

WEBER GF, ASHKAR S, GLIMCHER MJ, CANTOR H (1996) Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271, 509-512

WEBER GF, CANTOR H (1996) The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 241-248

WIMSATT WA (1951) Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *Am J Anat* 89, 233-81

WIMSATT WA (1962) Some aspects of the comparative anatomy of the mammalian placenta. *Am J Obstet Gynecol* 84, 1568-1594

WOODING FBP (1992) Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13, 101-13

WOODING FBP, FLINT APF (1994) Placentation. In: *Marshall's Physiology of Reproduction*. 4<sup>th</sup> edn (ed. Lamming GE), vol. III, part 1. Chapman and Hall, London, pp. 233-460

YOUNG MF, KERR JM, TERMINE JD, WEWER UM, WANG MG, MCBRIDE OW, FISHER LW (1990) cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 7, 491-502

## **VIII. ANHANG**

### **8.1 Verwendete Lösungen**

#### **8.1.1 Verwendete Lösungen zu Kapitel 2.2.1**

##### Herstellung von Chromgelatine-Objektträgern

10 min in 80%igem Alkohol entfetten

trocknen

5 g Gelatine in 1000 ml Aqua dest. auf 35°C erwärmen

0,5 g Chromalaun ( $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) zugeben und auf 40°C erwärmen

Lösung auf ca. 20°C abkühlen lassen

Mit Faltenfilter filtrieren

Objektträger 10 min in die Lösung eintauchen

Die beschichteten Objektträger über Nacht bei 37°C in den Trockenschrank stellen.

##### Herstellung der Gebrauchslösungen

PBS-Stammlösung: (phosphate buffered saline, pH 7,2)

42 g NaCl

11 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2,75 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

ad 1000 ml Aqua dest.

PBS Gebrauchslösung:

1 Teil PBS-Stammlösung

4 Teile Aqua dest.

BSA-Stammlösung: (Bovines Serumalbumin, Sigma, München.)

0,2 g kristallines BSA

ad 10 ml PBS

BSA-Gebrauchslösung:

50 µl BSA-Stammlösung

ad 5 ml PBS

Vectastain-Universal-ELITE-ABC-Kit® (Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.)

Zweit-Antikörper-Gebrauchslösung:

50 µl biotinylierter Antikörper (IgG, Anti-Maus/Anti-Kaninchen)

50 µl BSA-Stammlösung

ad 2,5 ml PBS

ELITE-ABC-Peroxidase-Gebrauchslösung:

1 Tropfen Reagenz A, Avidin-Dehydrogenase

1 Tropfen Reagenz B, biotinylierte Meerrettich-Peroxidase

ad 2,5 ml PBS

AEC-Gebrauchslösung

2 Tropfen Puffer

3 Tropfen AEC-Stammlösung

2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ad 5 ml Aqua dest.

### 8.1.2 Verwendete Lösungen zu Kapitel 2.2.3

Agarose-Gel (RNA-Gel)

0,5 g 1%ige Agarose in 43,5 ml Bidest lösen

in Mikrowelle aufkochen ⇒ abkühlen

5 ml 20x MOPS (3- Morpholinopropansulfonsäure)

1,5 ml 37%iges Formalin

5 µl Ethidiumbromid

Gel langsam ohne Luftblasen in die vorgegebene Form giessen.

Loading Buffer-Stammlösung

0,5 ml 1%iger Bromphenolblaulösung  
0,5 ml 1%iger Xylencyanollösung  
2 ml Glyzerol  
10 ml Formamid  
2 ml 10x MOPS  
3,4 ml 37%iges Formalin  
1,6 ml DEPC-Wasser  
alles filtrieren

Running Buffer (1x MOPS)

20x MOPS

41,8 g MOPS  
16,6 ml 3M Natriumacetat ( NaOAc)  
20 ml 0,5 M EDTA  
auf pH 7,0 einstellen  
auf 1 l mit DEPC-Wasser auffüllen

DEPC-Wasser

2 l Bidest  
2 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat)  
kräftig schütteln, über Nacht bei 37°C in Trockenschrank  
Autoklavieren

Essigsäure (20%ig)

160 ml DEPC-Wasser  
40 ml Eisessig  
Lagerung bei 4–20°C

TAE (1 x; pH 8,4; Tris-Azetat-EDTA-Puffer)

48,4 g TRIS (Trishydroxymethylaminomethan; Sigma, T-1503, München)  
11,4 ml Essigsäure  
20 ml 0,5 M EDTA  
Auffüllen auf 1 l Aqua bidest



### 8.1.3 Verwendete Lösungen zu Kapitel 2.2.4

#### APES-Beschichtung

APES (3-aminopropyltriethoxysilane; Sigma, A3648, München) wurde im Verhältnis 1:50 mit Azeton gemischt. Die Objektträger wurden 20 Sekunden in diese Lösung gestellt.

Spülen (2 x kurz) in Azeton

Spülen (2 x kurz) in Aqua dest.

Objektträger trocknen

#### 20x SSC Stammlösung

88,23 g Natriumcitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )

58,4 g NaCl

1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat, Sigma, D-5758, München)

ad 1 l Aqua bidest

Trockenschrank, über Nacht bei 37°C

Autoklavieren

#### DEPC-Wasser

2 l Aqua bidest

2 ml DEPC

Trockenschrank, über Nacht bei 37°C

Autoklavieren

#### PBSM-Puffer (1 x)

400 ml DEPC-Wasser

2 PBS-Tabletten (Sigma; P 4417, München)

2 ml 1M  $\text{MgCl}_2$

#### RNase A/T1-Stammlösung

25 mg/ml RNase A (Boehringer, 109134, Mannheim) in 2 x SSC

$10^5$  U/ml RNase T1 (Boehringer, 109193, Mannheim) in 2 x SSC

TNMT-Puffer (ph 7,5; 10 x)

121,1 g Tris-HCl

58,4 g NaCl

4,17 g  $\text{MgCl}_2$

1 ml DEPC

ad 1 l Aqua Bidest

Trockenschrank, über Nacht bei 37°C

Autoklavieren

Nach dem Erkalten Zugabe von 5 ml Triton-X-100

NTB-Puffer (5 x)

60,5 g Tris-HCL

29,2 g NaCl

1 ml DEPC

Trockenschrank, über Nacht bei 37°C

Autoklavieren

➤ Vor Gebrauch: Zugabe von 25 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung pro 500 ml 1x NTB-Puffer

Levamisol (1M)

2,4 g Levamisol (Sigma,L-9756. München)

10 ml 1 x NTB-Puffer

Lagerung bei -20°C

Paraformaldehyd (4%ig)

25 g Paraformaldehyd (Merck, 1.04005, Darmstadt)

500 ml 1 x PBSM-Puffer

NaOH zufügen bis Lösung klar wird

pH-Wert einstellen mit HCl (pH 7,0)

Denhardt-Reagenz (BFP) –20°C

200 mg BSA (2%)

200 mg Ficoll 400 (2%)

200 mg Polyvinylpyrrolidon (2%)

ad 10 ml DEPC-Wasser

Lagerung bei –20°C

Dextransulfat (50%)

5 g Dextransulfat (Sigma, D-8906, München)

ad 10 ml DEPC-Wasser

auflösen, 2 Tage im Kühlschrank stehen lassen

Lagerung bei –20°C

Essigsäure (20%)

160 ml DEPC-Wasser

40 ml Eisessig

Lagerung bei 4°C

HCl (0,2N)

2 ml HCl

234 ml DEPC-Wasser

Lagerung bei RT

## **Danksagung**

Frau PD Dr. Christiane Pfarrer danke ich für die Überlassung des Themas. Ganz besonders möchte ich mich für ihre uneingeschränkte Unterstützung und das in jeder Hinsicht entgegengebrachte Verständnis bei Erstellung dieser Arbeit bedanken. Die Korrekturen und Ratschläge haben mir sehr geholfen. Vielen Dank

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser möchte ich für die Überlassung des Themas, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sowie für seine Anregungen und Diskussionen herzlich danken.

Desweiteren danke ich Herrn Ph.D. Larry W. Fisher, Department of Health & Human Services USA, für die großzügige Bereitstellung der OPN Antikörper LF-123 und LF-124.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Olga Dakischew, Frau Alexandra Hax, Frau Sigrid Kettner, Frau Susanne Schubert-Porth und Frau Anne Hild für die stetige Hilfestellung bei labor- und fototechnischen Aufgaben. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie für die außergewöhnlich gute Arbeitsatmosphäre und die morgendlichen Frühstücksrunden.

Bei Prof. Dr. Steger bedanke ich mich für die Unterstützung in der Primer Auswahl und für die Hilfsbereitschaft bei PCR-Fragen.

Frau Dr. Carola Hauptmann, Herrn Dr. Daniel Werth und Frau Dr. Martina Zeiler danke ich ganz herzlich für Ihre Ausdauer und das entgegengebrachte Verständnis. Nicht nur in dieser Zeit, waren sie mir eine sehr große Hilfe. Vielen Dank

Vielen Dank Herrn Wolfgang Ketter für die Freistellung vom Klinikbetrieb und Frau Dr. Doris Fischer für die nette Vermittlung mit meiner Doktormutter

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie. Ganz besonders meiner Mutter, die durch ihr Vertrauen und ihrer Unterstützung mir ermöglichte, das Studium und diese Arbeit erfolgreich durchzuführen. Vielen Dank

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAU FEN BER GRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5222-6



9 7 8 3 8 3 5 1 9 5 2 2 2 5